

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 400 567**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/06**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2005 E 05777465 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2012 EP 1740601**

54 Título: **Inhibidores de cinasa de la cadena ligera de miosina y su uso**

30 Prioridad:

**21.04.2004 US 564313 P**

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

**10.04.2013**

73 Titular/es:

**THE UNIVERSITY OF CHICAGO (33.3%)**

**5801 South Ellis Avenue**

**Chicago IL 60637, US;**

**UNIVERSITY COLLEGE CARDIFF CONSULTANTS**

**LTD (33.3%) y**

**MCMASTER UNIVERSITY (33.3%)**

72 Inventor/es:

**TURNER, JERROLD R.;**

**MRSNY, RANDALL J. y**

**MCKAY, DEREK**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 400 567 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**

Inhibidores de cinasa de la cadena ligera de miosina y su uso.

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº 60/564.313 presentada el 21 de abril de 2004.

10 **DECLARACIÓN REFERENTE A INVESTIGACIÓN FEDERALMENTE PATROCINADA**

[0002] La presente invención se hizo con la ayuda del gobierno de los Estados Unidos concedida por el Instituto nacional de salud.

15 **INTRODUCCIÓN**

[0003] La presente invención se refiere a inhibidores de cinasa de la cadena ligera de miosina ("MLCK"). La cinasa de la cadena ligera de miosina cataliza la fosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) en presencia de  $Ca^{2+}$ /calmodulina y ATP, y regula la contracción de actomiosina, que participa en una amplia gama de actividades celulares, algunas de las cuales pueden participar en estados de enfermedad. Los inhibidores de MLCK pueden ser útiles en el tratamiento de o la mejora de tales estados de enfermedad.

[0004] LUKAS Y COL. (1999) J. MED. CHEM. 42, 910-919, describen la aplicación de un enfoque de descubrimiento basado en un mecanismo inhibidor intramolecular para una proteína cinasa regulada por calmodulina prototipo (CaM) con el fin de demostrar una prueba de principio para el desarrollo de inhibidores selectivos. El enfoque global usó análisis genómico funcional de cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) para identificar secuencias autoinhibidoras cortas que carecen de actividad de reconocimiento de CaM, seguido de producción de bibliotecas de péptidos combinatorias recursivas y cribados de actividad comparativos.

[0005] ZOLOTAREVSKY Y COL., (2002) GASTROENTEROLOGY 123, 163-172, describe el uso MLC recombinante y cinasa MLC de Caco-2 en ensayos de cinasa. Monocapas de T84 y Caco-2 se trataron con *Escherichia coli* (EPEC) enteropatógena o factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  e interferón (IFN)- $\gamma$  para inducir la disfunción de la barrera.

[0006] ADESSI Y COL. (2002) CURR. MED. CHEM. 9, 963-978, describen diferentes enfoques experimentales para transformar un péptido en un posible fármaco y proporcionan ejemplos de la utilidad de estas estrategias.

[0007] Chorev y Goodman (1995) TIBTECH 13, 438-445, describe peptidomiméticos de la cadena principal basados en inversión del enlace peptídico e inversión de quiralidad. También se describen las aplicaciones de estas alteraciones estructurales en, por ejemplo, el dímero VIH-D-proteasa y un opioide all-D-hexapéptido.

**RESUMEN DE LA INVENCION**

[0008] En un aspecto, la presente invención proporciona un inhibidor de cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que tiene hasta 120 aminoácidos y que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, en el que el 100% de los aminoácidos dentro de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 son D-aminoácidos, en el que el inhibidor retiene sustancialmente la misma inhibición fisiológica de MLCK con respecto al mismo inhibidor que tiene todos los L-aminoácidos.

[0009] En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 12.

[0010] En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 13.

[0011] En algunas realizaciones, el inhibidor comprende además una secuencia que elige como diana el transporte a membrana escindible.

[0012] En algunas realizaciones, el inhibidor comprende además un vehículo diana.

[0013] La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la invención.

[0014] También se proporcionan procedimientos para inhibir cinasa de la cadena ligera de miosina en una célula *in vitro* que comprende cinasa de la cadena ligera de miosina que comprende poner en contacto la célula con

el inhibidor de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de cadena ligera de miosina cinasa en la célula.

5 **[0015]** En algunas realizaciones, la célula seleccionada es del grupo que consiste en una célula epitelial, una célula endotelial y una célula de músculo liso. En algunas realizaciones, la célula es una célula de mamífero.

10 **[0016]** La invención proporciona además la composición farmacéutica de la invención usada en un procedimiento para inhibir cinasa de la cadena ligera de miosina en una célula que comprende cinasa de la cadena ligera de miosina, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con dicha composición farmacéutica.

**[0017]** La invención aún proporciona además el inhibidor de la invención para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno asociado a actividad de MLCK en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar el inhibidor al mamífero que tiene el trastorno.

15 **[0018]** En algunas realizaciones, el trastorno es producido o agravado por contracción de actomiosina mediada por MLCK.

20 **[0019]** En algunas realizaciones, el trastorno está seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, una enfermedad asociada a una falta vascular o endotelial, una enfermedad asociada a contracción de músculo liso, una enfermedad asociada a migración de células, una enfermedad asociada a angiogénesis, una enfermedad trombótica, y una enfermedad asociada a agregación de plaquetas.

25 **[0020]** En algunas realizaciones, la enfermedad intestinal está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de injerto frente a huésped, una enfermedad infecciosa, una enfermedad isquémica y una enfermedad inflamatoria.

**[0021]** En algunas realizaciones, el inhibidor inhibe migración de una célula.

30 **[0022]** En algunas realizaciones, la célula es una célula inflamatoria.

**[0023]** En algunas realizaciones, la célula es una célula de tumor.

35 **[0024]** En algunas realizaciones, el inhibidor se administra a un mamífero que tiene un tumor, siendo el inhibidor administrado en una cantidad eficaz para inhibir crecimiento tumoral.

**[0025]** En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad asociada a falta vascular o endotelial.

40 **[0026]** En algunas realizaciones, la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en septicemia, choque, anafilaxia y lesión pulmonar aguda.

**[0027]** En algunas realizaciones, el trastorno es una enfermedad asociada a contracción de músculo liso.

**[0028]** En algunas realizaciones, la enfermedad está seleccionada de asma y enfermedad hipertensiva.

45 **[0029]** En algunas realizaciones se administra una cantidad de inhibidor eficaz para inhibir agregación de plaquetas.

50 **[0030]** En algunas realizaciones se administra una cantidad del inhibidor eficaz para alterar cierre de heridas en bolsa de tabaco mediado por actomiosina de una célula epitelial.

**[0031]** En algunas realizaciones, una cantidad del inhibidor se administra a un mamífero en necesidad de alterar la zona de oclusión epitelial, eficaz para alterar la permeabilidad de la zona de oclusión epitelial.

55 **[0032]** En algunas realizaciones, la administración del inhibidor invierte una disfunción de la barrera epitelial.

**[0033]** En algunas realizaciones, la disfunción de la barrera epitelial está asociada con una citocina pro-inflamatoria.

60 **[0034]** En algunas realizaciones, el inhibidor es para administración por vía oral.

**[0035]** En algunas realizaciones, la enfermedad intestinal es enfermedad de Crohn.

**[0036]** En algunas realizaciones, la enfermedad intestinal es colitis ulcerosa

**[0037]** La invención proporciona el uso del inhibidor de la invención en la preparación de un medicamento para su uso en un procedimiento para inhibir crecimiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar dicho inhibidor al mamífero en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento del tumor.

5 **[0038]** La invención proporciona un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una bacteria que comprende administrar a la bacteria el inhibidor de la invención.

**[0039]** En algunas realizaciones, la bacteria es destruida tras la administración del inhibidor de la reivindicación 1.

10 **[0040]** La invención proporciona el inhibidor de la invención para su uso en el tratamiento de infección bacteriana.

15 **[0041]** En algunas realizaciones, la infección es una infección bacteriana enteropatógena, por ejemplo, una infección producida por una bacteria enteropatógena seleccionada de la lista que consiste en: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Clostridium difficile* y *Shigella flexneri*.

20 **[0042]** La invención proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el kit comprende instrucciones para su uso.

#### **DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS**

25 **[0043]** La cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) regula la contracción de actomiosina, que participa en una variedad de actividades celulares, que incluyen regulación de zonas de oclusión (ZO) epiteliales, migración de células, cierre de heridas en bolsa de tabaco y contracción muscular.

30 **[0044]** Se contempla que los compuestos y composiciones descritos en el presente documento puedan usarse para tratar una variedad de trastornos asociados a actividad de MLCK. Los inhibidores pueden usarse para tratar cualquier trastorno que es producido o exacerbado por la contracción de actomiosina mediada por MLCK dentro de células. Los inhibidores pueden usarse en una variedad de aplicaciones terapéuticas. Ejemplos de afecciones o trastornos en los que los inhibidores pueden tener valor terapéutico incluyen, pero no se limitan a, enfermedades intestinales tales como enfermedades inflamatorias infecciosas, isquémicas e idiopáticas, además de enfermedad de injerto frente a huésped; enfermedades producidas por agentes infecciosos que incluyen *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Clostridium difficile* y *Shigella flexneri*; enfermedades de ausencia endotelial tales como septicemia, choque, anafilaxia y lesión pulmonar aguda; enfermedades asociadas a contracción de músculo liso tales como asma y enfermedad hipertensiva; enfermedades asociadas a migración de células tales como inflamación y metástasis tumoral; enfermedades asociadas a angiogénesis tales como cáncer, enfermedades relacionadas con tumor, enfermedad cardíaca, retinopatía diabética; y enfermedades asociadas a agregación de plaquetas tal como enfermedad trombótica.

35 **[0045]** Las enfermedades intestinales están generalmente ligadas al aumento de la permeabilidad intestinal. La fosforilación de la cadena ligera reguladora de miosina II (MLC) está asociada a aumento de la permeabilidad de la ZO epitelial intestinal. Agentes infecciosos, que incluyen bacterias enteropatógenas, también pueden alterar la permeabilidad paracelular.

40 **[0046]** La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa son trastornos crónicos de los intestinos, conocidos en conjunto como enfermedad inflamatoria del intestino y están ligados al aumento de la permeabilidad intestinal. La permeabilidad intestinal aumenta en pacientes con enfermedad de Crohn activa e inactiva y en un subconjunto significativo de sus parientes de primer grado (May y col., *Gastroenterology* 1993; 104:1627-1632; Teahon y col., *Gut* 1992; 33:320-323). La enfermedad inflamatoria del intestino tiene un vínculo familiar y se han identificado varios genes relacionados con la enfermedad inflamatoria del intestino. El aumento de la permeabilidad intestinal es un marcador de pronóstico para el desarrollo de la enfermedad debido a que la reactivación de la enfermedad de Crohn inactiva va precedida del aumento de la permeabilidad intestinal (Arnott y col., *Scand J Gastroenterol* 2000; 35:1163-1169). Estos datos sugieren que el aumento de la permeabilidad intestinal es un acontecimiento temprano en la patogénesis de la enfermedad de Crohn.

45 **[0047]** La enfermedad de injerto frente a huésped también está ligada al aumento de la permeabilidad intestinal. La enfermedad de injerto frente a huésped es producida por linfocitos T donantes maduros que son activados por aloantígenos expresados por las células presentadoras de antígeno huésped. El aumento de la permeabilidad intestinal y la diarrea pueden ser debidos a un aumento en citocinas, tales como TNF- $\alpha$ .

50 **[0048]** Los inhibidores de MLCK pueden ser eficaces en inhibir metástasis tumorales tanto reduciendo la migración de células como destruyendo directamente o hiriendo células tumorales. Cuando cantidades eficaces de

un inhibidor de MLCK se administran a pacientes con cáncer o neoplasias, o a tumores, la actividad proliferativa de las células neoplásicas anormales se inhibe, reduce o estabiliza.

**[0049]** Los vertebrados tienen al menos dos genes MLCK: MLCK de músculo esquelético y MLCK de músculo liso. La MLCK de músculo liso se encuentra ubicuamente en tejidos adultos, mientras que la MLCK de músculo esquelético es específica de tejido. Los vertebrados expresan una forma corta y larga de MLCK, además de un módulo de Ig del extremo C relacionado: la proteína de no cinasa telokina. La MLCK de forma corta incluye un núcleo catalítico, una secuencia reguladora que contiene un dominio autoinhibidor y de unión a  $Ca^{2+}$ /calmodulina y una secuencia de unión a actina en el extremo N. La MLCK de forma larga incluye los dominios de la forma corta y también una extensión del extremo N con motivos de unión a actina adicionales. La MLCK de forma larga no se expresa normalmente en células de músculo liso, y también se conoce como MLCK de 210 KDa, de no músculo o endotelial. La MLCK está regulada por interacciones intramoleculares entre el dominio catalítico y el dominio autoinhibidor. El dominio inhibidor, junto con otros péptidos informados por tener capacidad inhibidora de MLCK, tienden a ser reconocidos y escindidos por proteasas, particularmente aquellas del estómago e intestino.

**[0050]** En el presente documento se describen inhibidores de MLCK que inhiben la actividad de MLCK, son resistentes a la degradación por proteasas y presentan estabilidad *in vivo*. Más preferentemente, los inhibidores muestran especificidad por la inhibición de MLCK con respecto a otras cinasas y/o están diseñados para resistir la degradación por una proteasa. Se proporcionan inhibidores que inhiben la MLCK expresada dentro de células endoteliales, epiteliales, otras de no músculo, o células de músculo liso.

**[0051]** Un inhibidor de MLCK es uno que inhibe la fosforilación de MLC o previene o reduce la contracción de actomiosina. Como se describe en los ejemplos más adelante, los inhibidores pueden ensayarse usando un ensayo *in vitro* que comprende los sustratos MLC y  $\gamma$ -ATP. Los efectos del inhibidor administrado a una célula o capa epitelial de células que comprenden MLCK pueden medirse bioquímicamente, mediante la obtención de imágenes o por su correlación con una disminución en la resistencia transepitelial (RTE). Además, el flujo de metabolitos marcados, tales como  $^3H$ -manitol, a través de una monocapa de células epiteliales en presencia o ausencia de un inhibidor de MLCK putativo puede medirse, y se usa como un ensayo de la eficacia del inhibidor (Zolotarevsky y col., Gastroenterology 124, 163-172, 2002).

**[0052]** Como se usa en el presente documento, un inhibidor puede ser un péptido o un mimético de péptido que previene la fosforilación de la cadena ligera de miosina por MLCK. Un inhibidor de péptidos de la presente invención puede comprender L-aminoácidos, D-aminoácidos o una combinación de L-aminoácidos y D-aminoácidos.

**[0053]** Inhibidores preferidos descritos en el presente documento tienen la fórmula general

A-B-C

en la que B está covalentemente unido a A y C, y en la que A y C comprenden cada uno al menos dos aminoácidos básicos y B comprende al menos tres aminoácidos Xaa1, Xaa2 y Xaa3. Adecuadamente, A y C pueden comprender cada uno al menos tres aminoácidos básicos. El inhibidor preferido A-B-C comprende además al menos un D-aminoácido, o un enlace no hidrolizable.

**[0054]** En una realización preferida, Xaa1 de B está seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Val, Lys, Gln, Phe, Ser, Pro, Thr, Asn y Arg; Xaa2 está covalentemente unido a Xaa1, y está seleccionado del grupo que consiste en Lys, Val, Thr, Trp, His, Met, Asn, Ala, Glu, Phe, Gln y Arg; y Xaa3 está covalentemente unido a Xaa2, y está seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Tyr.

**[0055]** En una realización, Xaa1 de B está seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Val, Lys, Gln y Phe; Xaa2 está seleccionado del grupo que consiste en Lys, Val, Thr, Trp y His; y Xaa3 está seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Met, Pro, Ser y Phe.

**[0056]** En una realización particularmente preferida, B comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en Tyr-Lys-Ala, Tyr-Lys-Asp, Tyr Lys-Glu, Tyr-Lys-Phe, Tyr-Lys-Gly, Tyr-Lys-Lys, Tyr-Lys-Leu, Tyr-Lys-Met, Tyr-Lys-Asn, Tyr Lys-Pro, Tyr-Lys-Gln, Tyr-Lys-Arg, Tyr-Lys-Ser, Tyr-Lys-Thr, Tyr-Lys-Val y Tyr-Lys-Tyr.

**[0057]** En una realización preferida, A y C comprenden cada uno arginina, lisina o una combinación de las mismas. En inhibidores preferidos, los enlaces covalentes entre B y A, y entre B y C, o entre Xaa2 y Xaa1, y Xaa2 y Xaa3, son enlaces peptídicos.

**[0058]** Como se usa en el presente documento, un enlace no hidrolizable es uno que resiste a la hidrólisis por una enzima (por ejemplo, una proteasa). Un experto en la materia apreciará qué enlaces no hidrolizables pueden hidrolizarse si se someten a condiciones extremas, tales como calentamiento en una base o ácido fuerte.

Sin embargo, tal hidrólisis está fuera del alcance del término no hidrolizable como se usa en el presente documento.

5 **[0059]** Puede desearse prevenir la degradación de los inhibidores. La degradación del inhibidor puede prevenirse incluyendo un enlace peptídico no hidrolizable. Tales enlaces, y procedimientos para sintetizar péptidos que contienen tales enlaces, son conocidos en la técnica. Ejemplos de enlaces no hidrolizables incluyen, pero no se limitan a, enlaces peptídicos de tioxo, enlaces peptídicos de amida reducida, enlaces peptídicos de cetometileno, enlaces peptídicos de (cianometileno)amino, enlaces peptídicos de hidroxietileno y enlaces peptídicos de tiometileno (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. 6.172.043. Las estructuras de ciertos enlaces peptídicos no hidrolizables se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

Tipo de enlace	Estructura
enlace peptídico de tioxo	$\begin{array}{c} \text{---C---N---} \\ \parallel \\ \text{S} \\ \text{H} \end{array}$
enlace peptídico de amida reducida	$\text{---CH}_2\text{---N---}$ $\text{H}$
enlace peptídico de cetometileno	$\begin{array}{c} \text{---C---CH}_2\text{---} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$
enlace peptídico de (cianometileno)amino	$\begin{array}{c} \text{---CH---N---} \\   \\ \text{CN} \\ \text{H} \end{array}$
enlace peptídico de hidroxietileno	$\begin{array}{c} \text{---CH}_2\text{---CH---} \\   \\ \text{OH} \end{array}$
enlace peptídico de tiometileno	$\text{---CH}_2\text{---S---}$

15 **[0060]** Se entiende adicionalmente que cualquier valor numérico recitado en el presente documento incluye todos los valores desde el valor inferior hasta el valor superior. Por ejemplo, si se establece que un péptido tiene 7 a 300 aminoácidos, se pretende que valores tales como 7 a 25, 8 a 30, 9 a 90 ó 50 a 300 estén expresamente enumerados en esta memoria descriptiva. Éstos son sólo ejemplos de lo que se pretende específicamente, y debe considerarse que todas las posibles combinaciones de valores numéricos entre el valor inferior y el valor superior enumeradas están expresamente establecidas en la presente solicitud.

20 **[0061]** Los inhibidores de péptidos puede comprender uno o más D-aminoácidos. Como se demuestra en los ejemplos más adelante, un inhibidor de MLCK que comprende el 100% de D-aminoácidos tiene una semivida prolongada en presencia de líquido intestinal de rata en comparación con un péptido de longitud comparable que comprende L-aminoácidos. Se prevé que un péptido que comprende menos del 100% de D-aminoácidos también resista a la proteólisis.

25 **[0062]** También se prevé que ajustando la proporción de D-aminoácidos contenida dentro de un inhibidor un experto en la materia identifique un inhibidor de MLCK que tiene una semivida intermedia a la de un inhibidor que tiene todos los D-aminoácidos y un inhibidor que tiene todos los L-aminoácidos. Inhibidores útiles en aplicaciones en las que se desea una semivida intermedia pueden tener del 10% al 100% de D-aminoácidos. Preferentemente, el inhibidor de MLCK tendría un número de D-aminoácidos suficiente para resistir a la proteólisis, propiedad que podría medirse usando cualquier procedimiento adecuado, por ejemplo, como se describe en los ejemplos.

30 **[0063]** Los compuestos inhibidores de MLCK pueden basarse en un dominio de inhibición intramolecular de MLCK de músculo liso. Un dominio de inhibición preferido tiene la secuencia de MLCK humana (SEQ ID NO: 1). Basándose en una comparación de dominios de inhibición de MLCK de *Ovis aries* (SEQ ID NO: 2), *Tetraodon nigroviridis* (SEQ ID NO: 3), *Carassius auratus* (SEQ ID NO: 4) y *Canis familiaris* (SEQ ID NO: 5) puede derivarse una secuencia consenso (Xaa-Lys-Lys-Leu-Ser-Lys-Xaa-Arg-Met-Lys-Lys-Tyr-Xaa-Xaa-Arg-Arg-Lys-Trp-Gln-Lys-Xaa-Xaa; SEQ ID NO: 6) en la que cada Xaa representa cualquier aminoácido natural o modificado.

35 **[0064]** Aunque en realizaciones preferidas la secuencia del dominio de inhibición de MLCK usada en el presente documento se deriva de MLCK humana, también se contempla que la secuencia pueda derivarse de otra fuente de mamífero, o de la secuencia consenso descrita anteriormente (SEQ ID NO: 6). En realizaciones particularmente preferidas, el péptido inhibidor comprende la inversa de una secuencia contigua del dominio inhibidor.

**[0065]** Los inhibidores de péptidos pueden contener una o más variaciones en la secuencia del dominio inhibidor. Tales variantes pueden sintetizarse y probarse para la actividad de cinasa MLCK (Lukas y col., J. Med. Chem. 42, 910-919, 1999). Por tanto, inhibidores incluyen péptidos que comprenden cualquier número de 7 a 22 aminoácidos contiguos del dominio inhibidor de MLCK, o la inversa del mismo. Péptidos particularmente preferidos comprenden SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, en las que uno o más de los aminoácidos son D-aminoácidos, o las secuencias contienen uno o más enlaces no hidrolizables.

**[0066]** Adecuadamente, en un inhibidor de MLCK de no péptido, de 1 a 9 de los aminoácidos son D-aminoácidos. En una realización particularmente preferida, el inhibidor de MLCK que contiene todos los D-aminoácidos es el inverso (extremo N a extremo C) de un inhibidor de MLCK que contiene todos los L-aminoácidos. Una secuencia inversa significa entonces que el aminoácido del extremo C se convierte en el aminoácido del extremo N de la secuencia inversa, siguiendo los restantes aminoácidos en orden inverso. A modo de ejemplo, la inversa de la secuencia FLM es MLF.

**[0067]** Se prevé que el residuo de aminoácido central (la lisina en la posición 5) de tanto SEQ ID NO: 12 como SEQ ID NO: 13 pueda estar sustituido con cualquier residuo de aminoácido y todavía sirva para inhibir MLCK.

**[0068]** También se prevé que el palíndromo de tres aminoácidos central (los residuos de tirosina-lisina-tirosina en las posiciones 4, 5 y 6) de tanto SEQ ID NO: 12 como SEQ ID NO: 13 pueda estar sustituido con cualquier residuo de aminoácido y todavía sirva para inhibir MLCK.

**[0069]** Se prevé un péptido que comprende una secuencia de nueve o más aminoácidos, tal como SEQ ID NO: 14, en la que la región central A de la secuencia (aminoácidos en la posición 4, 5 y 6 de SEQ ID NO: 14) está flanqueada por secuencias que comprenden dos o más, o tres o más, aminoácidos básicos. En una realización preferida, la región central consiste en tres aminoácidos y las regiones de flanqueamiento comprenden cada una tres aminoácidos básicos. En esta realización, la región central puede comprender además dos residuos de tirosina, flanqueando cada residuo de tirosina un aminoácido central.

**[0070]** Se prevé que la selección de diferentes aminoácidos dentro de la región central del inhibidor de péptidos produzca inhibidores que tienen un intervalo de actividades inhibitoras de MLCK, que pueden confeccionarse para su uso en diferentes situaciones terapéuticas, o que puede usarse para regular la fosforilación de la cadena ligera de miosina según una necesidad particular.

**[0071]** Los inhibidores de péptidos usados en el presente documento pueden ser péptidos de entre 7 y 300 o más residuos de aminoácidos de longitud. Los fragmentos que serán útiles pueden ser de cualquier longitud de 7 aminoácidos de longitud a aproximadamente 300 aminoácidos de longitud.

**[0072]** Como se usa en el presente documento, un aminoácido pretende referirse a una molécula que contiene un grupo amino y un grupo ácido carboxílico. Un aminoácido puede ser un aminoácido natural o un aminoácido no natural. Aminoácidos naturales son aquellos comúnmente encontrados en proteínas que se producen naturalmente. Aminoácidos no naturales incluyen aminoácidos no encontrados comúnmente en proteínas que se producen naturalmente, tal como aminoácidos modificados.

**[0073]** Aminoácidos modificados incluyen, por ejemplo, ácido 2-aminoadípico, ácido 3-aminoadípico, beta-alanina, ácido beta-aminopropiónico, ácido 2-aminobutírico, ácido 4-aminobutírico, ácido piperidínico, ácido 6-aminocaproico, ácido 2-aminoheptanoico, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminoisobutírico, ácido 2-aminopimélico, ácido 2,4-diaminobutírico, desmosina, ácido 2,2'-diaminopimélico, ácido 2,3-diaminopropiónico, N-etilglicina, N-etilaspargina, hidroxilisina, alo-hidroxilisina, 3-hidroxi prolina, 4-hidroxi prolina, isodesmosina, alo-isoleucina, N-metilglicina, sarcosina, N-metilisoleucina, 6-N-metilisina, N-metilvalina, norvalina, norleucina u ornitina.

**[0074]** Además de la estructura general A-B-C definida anteriormente, un inhibidor de péptidos puede comprender una secuencia que sirve para permitir que el inhibidor cruce pasivamente la membrana celular. Se prevé que los inhibidores de péptidos puedan comprender además secuencias que eligen diana que facilitan la entrada del inhibidor en una célula. A modo de ejemplo, tales secuencias que eligen diana pueden incluir, pero no se limitan a, el dominio de transducción de la proteína TAT del VIH (SEQ ID NO: 7), el péptido señal del factor de crecimiento de fibroblastos de Kaposi (SEQ ID NO: 8), la secuencia señal de integrina beta<sub>3</sub> humana (SEQ ID NO: 9), el dominio de transducción de la proteína VP22 del VHS (SEQ ID NO: 10), el factor de transcripción homeótico en *Drosophila antennapedia* (SEQ ID NO: 11), proteínas de la envoltura del virus de Flock house, o péptidos de segmentos de cremallera de leucina básicos de proteínas de unión a ADN tales como c-Fos, c-Jun y GCN4.

**[0075]** Los inhibidores de MLCK también pueden ligarse a un ligando o vehículo que tiene una alta afinidad por un tipo de célula particular, tejido u órgano, y así facilitar la administración elegida como diana a ese tipo de célula, tejido u órgano. Un vehículo diana es adecuadamente uno que aumenta la administración del inhibidor de MLCK para una diana deseada (por ejemplo, una célula elegida como diana, un órgano elegida como diana, un

componente elegido como diana de un tejido de interés, un tumor, etc.). Los vehículos diana incluyen adecuadamente funcionalidades químicas que presentan especificidad diana, por ejemplo, hormonas (por ejemplo, modificadores de la respuesta biológica) y anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos monoclonales o policlonales), o fragmentos de anticuerpos que tienen la especificidad diana requerida, por ejemplo, por antígenos de superficie de células específicos. En la técnica se conocen varios vehículos tales como anticuerpos monoclonales y sistemas de administración coloidales tales como liposomas y microsferas o microcápsulas poliméricas formadas de polímeros biocompatibles. Véase, por ejemplo, Davis y col. en *Site-Specific Drug Delivery* (Tomlinson y col. eds.), John Wiley, Nueva York, 1986, pág. 93; Roth y col., patente de EE.UU. 5.879.713. También se ha informado del uso de hepatopos (Charodhury, N.L., y col., *J. Biol. Chem.* 268, 11265 (1993)) e inmunoliposomas. Moléculas solubles que incluyen oligonucleótidos, lectinas, poli-L-lisina, virosomas, insulina, dextranos, HCG, dipéptidos, lipoproteínas y sistemas celulares tales como eritrocitos y fibroblastos pueden facilitar la administración de inhibidores de MLCK a una célula diana o tejido. Véanse, por ejemplo, Poznansky y col., *36 Pharmacol. Rev.* 277 (1984); Counsell y col., *25 J. Med. Chem.* 1115 (1982); Takle, y col., patente de EE.UU. 5.891.689; Chari y col., patente de EE.UU. 5.846.545.

**[0076]** Vehículos que buscan tumores incluyen ciertos anticuerpos tales como anticuerpos para factor de permeabilidad vascular y anticuerpos monoclonales, proteínas glucosiladas oxidadas, polilisina, albúmina de suero humano, dextranos, péptidos y proteínas que tienen una afinidad por receptores particulares tales como receptor de péptido liberador de gastrina, receptor del factor de crecimiento epidérmico, receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, receptor del factor de necrosis tumoral, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos, receptor del factor de crecimiento similar a la insulina, receptor de transferrina, receptor de laminina, receptores de citocinas, receptor de fibronectina, receptor de interleucina, receptores de interferón, receptor de bombesina/péptido liberador de gastrina, receptor de somatostatina, etc., compuestos y polímeros polianiónicos tales como sumarina y análogos y derivados de sumarina, compuestos polisulfatados y polímeros tales como heparina, sulfato de heparano, sulfato de condroitina, sulfato de queratano, sulfato de dermatano, quitina sulfatada, quitosano sulfatado, ácido algínico sulfatado, polisulfato de pentosano, ciclodextrinas sulfatadas y polímeros orgánicos sintéticos que incluyen poliestireno sulfonato, poli(alcohol vinílico) sulfatado, poli(sulfato de vinilo) y poli(sulfonato de etileno), y análogos de hormonas peptídicas tales como LH-RH, bombesina y somatostatina.

**[0077]** Los vehículos que eligen como diana endotelio pueden incluir anticuerpos CD31. Los vehículos que eligen como diana hueso pueden incluir moléculas tales como bisfosfonatos, estrógenos y otros esteroides tales como deshidroepiandrosterona (DHEA), tetraciclina y polimalonatos. Los vehículos que eligen como diana la piel incluyen ciertos quelatos de ión metálico-aminoácido; las moléculas que buscan la próstata incluyen ciertos esteroides tales como DHEA. Los vehículos que eligen como diana hígado incluyen triglicéridos, particularmente triglicéridos de cadena media.

**[0078]** Los inhibidores pueden ser lineales, o pueden ser circulares o ciclarse por medios naturales o sintéticos, siempre que los inhibidores retengan actividad inhibidora de MLCK. Por ejemplo, los enlaces disulfuro entre residuos de cisteína pueden ciclar una secuencia de péptidos. Pueden usarse reactivos bifuncionales para proporcionar un enlace entre dos o más aminoácidos de un péptido. En la técnica también se conocen otros procedimientos para la ciclación de péptidos, tales como aquellos descritos por Anwer y col. (*Int. J. Pep. Protein Res.* 36:392-399, 1990) y Rivera-Baeza y col. (*Neuropeptides* 30:327-333, 1996).

**[0079]** Los inhibidores pueden obtenerse por procedimientos de síntesis de péptidos automatizada convencional como se describen en los ejemplos, o pueden pedirse comercialmente de proveedores de péptidos a medida. Principios generales para diseñar y preparar proteínas son muy conocidos para aquellos expertos en la materia.

**[0080]** Los inhibidores pueden sintetizarse en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales. Los inhibidores pueden prepararse a partir de una variedad de esquemas sintéticos o enzimáticos, que son muy conocidos en la técnica. Si se desean inhibidores cortos, tales inhibidores pueden prepararse usando síntesis de péptidos automatizada en disolución o sobre un soporte sólido según técnicas convencionales.

**[0081]** Los inhibidores también pueden modificarse, y tales modificaciones pueden llevarse a cabo en el sintetizador con intervenciones muy pequeñas. Una amida podría añadirse al extremo C del inhibidor. Un grupo acetilo, biotina, estearato y otras modificaciones podrían añadirse al extremo N. Otras modificaciones pueden incluir añadir un resto al inhibidor que permita que el inhibidor se una covalentemente a MLCK, de forma que tal inhibición de la molécula MLCK fuera irreversible. Adecuadamente, el inhibidor puede sintetizarse para contener uno o más D-aminoácidos. Procedimientos de producción de péptidos que contienen D-aminoácidos son muy conocidos en la técnica (Pritsker y col., *PNAS USA* 95; 13:7287-7292).

**[0082]** Los  $\beta$ -péptidos tienen un esqueleto que se diferencia de los péptidos normales por la presencia de una unidad de metileno adicional. Los  $\gamma$ -péptidos tienen dos unidades de metileno en el esqueleto adicionales, en comparación con los péptidos naturales, y de ahí que permitan la sustitución de cadenas laterales de dos posiciones diferentes por unidad de monómero.

**[0083]** Los ejemplos más adelante describen inhibidores de MLCK que inhiben el crecimiento de bacterias o son bactericidas. Se prevé específicamente que otras bacterias puedan ser susceptibles a inhibidores de MLCK de un modo similar a aquellos descritos en los ejemplos. Está perfectamente dentro de la capacidad de un experto en la materia cribar y obtener otras bacterias susceptibles sobre las que un inhibidor de MLCK puede tener un efecto similar.

**[0084]** Los inhibidores de MLCK son útiles como principios activos en composiciones farmacéuticas para administración para el tratamiento de una variedad de trastornos asociados a actividad de MLCK. Estas composiciones farmacéuticas pueden tener uso particular en alterar la permeabilidad de una zona de oclusión epitelial *in vivo*. Se prevé que una composición farmacéutica comprenda un inhibidor que tiene la fórmula general

A-B-C

en la que B está ligado covalentemente a A y C y en la que A y C comprenden cada uno al menos dos aminoácidos básicos y B comprende Xaa1-Xaa2-Xaa3, en la que Xaa1 está seleccionado del grupo que consiste en Tyr, Val, Lys, Gln, Phe, Ser, Pro, Thr, Asn y Arg; Xaa2 está covalentemente unido a Xaa1, y está seleccionado del grupo que consiste en Lys, Val, Thr, Trp, His, Met, Asn, Ala, Glu, Phe, Gln y Arg; y Xaa3 está covalentemente unido a Xaa2, y está seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, Glu, Phe, Gly, Lys, Leu, Met, Asn, Pro, Gln, Arg, Ser, Thr, Val y Tyr. Adecuadamente, Xaa1 de B está seleccionado de Tyr, Val, Lys, Gln o Phe; Xaa2 de B está seleccionado de Lys, Val, Thr, Trp o His; y Xaa3 de B está seleccionado de Tyr, Met, Pro, Ser o Phe. Adecuadamente, A y C pueden comprender cada uno al menos tres aminoácidos básicos.

**[0085]** Los inhibidores farmacológicamente activos pueden procesarse según procedimientos convencionales de farmacia para producir agentes farmacéuticos para la administración a pacientes, por ejemplo, en mezclas con excipientes convencionales tales como sustancias de vehículo orgánico o inorgánico farmacéuticamente aceptables adecuadas para administración parenteral, enteral (por ejemplo, oral), tópica o transdérmica que no reaccionan perjudicialmente con los compuestos activos.

**[0086]** También se prevén otras vías de administración convencionales, por ejemplo, por administración subcutánea, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, intraocular, retrobulbar, intrapulmonar (por ejemplo, administración a plazo), por aerosol, sublingual, nasal, anal, vaginal o transdérmica, o por inyección directa en un sitio particular o administración regional mediante administración intraarterial o la vena portal. El tratamiento puede consistir en una dosis unitaria única o una pluralidad de dosis durante un periodo de tiempo. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes.

**[0087]** Una dosis unitaria es una cantidad discreta de una composición terapéutica dispersada en un vehículo adecuado. En ciertas realizaciones, la administración parenteral de los compuestos terapéuticos se lleva a cabo con un bolo inicial, seguido de infusión continua para mantener niveles en circulación terapéuticos del producto terminado. Aquellos expertos habituales en la materia optimizarán fácilmente dosificaciones eficaces y pautas de administración como se ha determinado por la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual.

**[0088]** Vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados incluyen, pero no se limitan a, agua, disoluciones salinas (tampón), alcoholes, goma arábiga, aceites minerales y vegetales, alcoholes bencílicos, polietilenglicoles, gelatina, hidratos de carbono tales como lactosa, amilosa o almidón, estearato de magnesio, talco, ácido silícico, parafina viscosa, esencia de perfume, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres de ácidos grasos de pentaeritritol, hidroximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, etc.

**[0089]** Las preparaciones farmacéuticas pueden esterilizarse y, si se desea, mezclarse con agentes auxiliares, por ejemplo, lubricantes, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, emulsionantes, sales para influir la presión osmótica, tampones, compuestos activos colorantes, aromatizantes y/o aromáticos. Si se usa un vehículo sólido farmacéuticamente aceptable, la forma de dosificación de los análogos puede ser comprimidos, cápsulas, polvos, supositorios o pastillas para chupar. Si se usa un vehículo líquido, cápsulas de gelatina blanda, parches transdérmicos, esprays de aerosol, cremas tópicas, jarabes o suspensiones líquidas, emulsiones o disoluciones pueden ser la forma de dosificación.

**[0090]** Para administración parenteral son particularmente adecuadas disoluciones estériles inyectables, preferentemente disoluciones aceitosas o acuosas, además de suspensiones, emulsiones o implantes que incluyen supositorios. Las ampollas son dosificaciones unitarias convenientes. La dosificación de inhibidores de MLCK para administración parenteral es adecuada entre 1 y 300 mg por día, o una cantidad suficiente para mantener una dosis de inhibidor de MLCK entre 50 y 500  $\mu\text{M}$  en contacto con el epitelio continuamente.

**[0091]** Para administración enteral son particularmente adecuados comprimidos, comprimidos recubiertos de azúcar, líquidos, gotas, supositorios o cápsulas tales como cápsulas de gelatina blanda. Puede usarse un jarabe, elixir o similares cuando se emplea un vehículo edulcorado.

5 **[0092]** Pueden formularse composiciones de liberación sostenida o dirigida, por ejemplo, liposomas o aquellos en los que el compuesto activo se protege con recubrimientos diferencialmente degradables, tal como por microencapsulación, múltiples recubrimientos, etc. También es posible liofilizar inhibidores de MLCK y usar los liofilizados obtenidos, por ejemplo, para la preparación de productos para inyección. También es posible la administración transdérmica de composiciones farmacéuticas de los análogos de fórmula (I).

10 **[0093]** Para administración tópica se emplean como formas no pulverizables, formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo compatible con la administración tópica y que tiene una viscosidad dinámica, preferentemente superior a la del agua. Formulaciones adecuadas incluyen, pero no se limitan a, disoluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, pomadas, polvos, linimentos, pomadas, aerosoles, etc., que, si se desea, se esterilizan o mezclan con agentes auxiliares, por ejemplo, conservantes, etc.

15 **[0094]** Para la administración directa de los inhibidores de MLCK, por ejemplo, administrados directamente a un tumor, la dosificación oscila entre 5 mg y 1500 mg/dosis, adecuadamente entre 200-800 mg/dosis.

20 **[0095]** Las formas de dosificación también pueden contener adyuvantes, tales como adyuvantes conservantes o estabilizantes. También pueden contener otras sustancias terapéuticamente valiosas o pueden contener más de uno de los compuestos especificados en el presente documento y en las reivindicaciones en mezcla.

25 **[0096]** Como se ha descrito anteriormente en este documento, los inhibidores de MLCK se administran preferentemente a pacientes humanos o animales en formulación de dosificación oral para el tratamiento de disfunción intestinal. Cuando un inhibidor es liberado de la formulación de dosificación oral, se absorbe en las células intestinales, o del intestino a la sangre.

30 **[0097]** La administración por vía oral se prefiere para algunas enfermedades en las que la MLCK puede desempeñar una función, tal como enfermedades intestinales. Generalmente, una cantidad adecuada oscila de 1 a 3000 mg por día, o suficiente para mantener continuamente una dosis de inhibidor entre 50 y 500  $\mu\text{M}$  en contacto con el epitelio en un vehículo farmacéuticamente aceptable por dosificación unitaria.

35 **[0098]** Por ejemplo, para el tratamiento de cáncer y otra enfermedad relacionada con tumor, el grupo de prueba puede recibir de 0,1 mg a 500 mg/kg de peso corporal del fármaco basado en péptido por día por administración parenteral en el sitio del cáncer o tumor.

40 **[0099]** Aquellos expertos en la materia optimizarán fácilmente dosis eficaces y pautas de co-administración (como se describen en el presente documento más adelante) como se ha determinado por la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual. Independientemente del modo de administración se apreciará que las cantidades preferidas reales del compuesto activo en un caso específico variarán según la eficacia del compuesto específico empleado, las composiciones particulares formuladas, el modo de administración y el sitio particular y organismo que se trata. Por ejemplo, la dosis específica para un paciente particular depende de la edad, sexo, peso corporal, estado general de salud, de la dieta y el momento y modo de administración, de la tasa de secreción y de los medicamentos usados en combinación, y la gravedad del trastorno particular al que se administra la terapia. Dosificaciones para un paciente dado pueden determinarse usando consideraciones convencionales, por ejemplo, por comparación habitual de las actividades diferenciales de los compuestos objeto y de un agente conocido tal como por medio de un protocolo farmacológico convencional apropiado. Un médico de experiencia habitual puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz del fármaco requerida para contrarrestar o detener el progreso de la afección. La precisión óptima en alcanzar las concentraciones de fármaco dentro del intervalo que da la eficacia sin toxicidad requiere una pauta basada en la cinética de la disponibilidad del fármaco para sitios diana. Esto implica una consideración de la distribución, equilibrio y eliminación de un fármaco. La dosificación de principio activo en las composiciones puede variarse; sin embargo, es necesario que la cantidad del principio activo sea de forma que se obtenga una dosificación eficaz. El principio activo se administra a pacientes (animales y humanos) en necesidad de tratamiento en dosificaciones que proporcionarán eficacia farmacéutica óptima.

55 **[0100]** La dosis total de agente terapéutico puede administrarse en múltiples dosis o en una dosis única. En ciertas realizaciones, los compuestos o composiciones se administran solos, en otras realizaciones los compuestos o composiciones se administran conjuntamente con otros terapéuticos dirigidos a la enfermedad o dirigidos a otros síntomas de la misma.

60 **[0101]** Adecuadamente, las composiciones se preparan para administración directamente al pulmón, en las que la vía de administración preferida es por vía oral mediante un inhalante. Un dispositivo de inhalador es cualquier dispositivo útil en la administración del medicamento inhalable. Ejemplos de dispositivos de inhalador incluyen nebulizadores, inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, aparatos de respiración de presión positiva intermitente, humidificadores, entornos de burbujas, cámaras de oxígeno, máscaras de oxígeno y respiradores artificiales. Se contempla particularmente que los inhibidores de péptidos se formulen como composiciones

inhalables. Las composiciones incluyen kits en los que el medicamento inhalable se formula en un recipiente adecuado para administración por inhalación.

5 **[0102]** Los inhibidores usados en los procedimientos terapéuticos pueden modificarse con el fin de mejorar su eficacia terapéutica mediante una disminución en la toxicidad, aumento en el tiempo en circulación o modificación de la biodistribución. Una estrategia para mejorar la viabilidad del fármaco es la utilización de polímeros solubles en agua (Greenwald y col., Crit Rev Therap Drug Carrier Syst. 2000; 17:101-161; Kopecek y col., J Controlled Release, 74:147-158, 2001).

10 **[0103]** Aquellos expertos en la materia son conscientes de técnicas de PEGilación para la eficaz modificación de fármacos (Harris y col., Clin Pharmacokinet. 2001; 40(7):539-51). En un enfoque diferente, los copolímeros de PEG y aminoácidos se exploraron como biomateriales novedosos que retendrían las propiedades de biocompatibilidad de PEG, pero que tendrían la ventaja añadida de numerosos puntos de unión por molécula (proporcionando mayor carga de fármaco), y que podrían diseñarse sintéticamente para adaptarse a una variedad de aplicaciones (Nathan y col., Macromolecules. 1992; 25: 4476-4484; Nathan y col., Bioconj Chem. 1993; 4:54-62).

15 **[0104]** Los inhibidores de MLCK pueden administrarse en una forma no activa. Pueden usarse ligadores para mantener el agente terapéutico en una forma de pro-fármaco hasta que sea liberada del polímero de esqueleto por un desencadenador específico, normalmente actividad enzimática en el tejido elegido como diana (véase la patente de EE.UU. nº 6.673.574). Por ejemplo, el inhibidor de MLCK puede unirse a un ligador mediante sitios de escisión proteolítica fuera del núcleo activo del inhibidor de MLCK. Bibliotecas del grupo de enlace para su uso en la administración de fármacos activados son conocidas para aquellos expertos en la materia y pueden basarse en cinética de enzimas, prevalencia de enzima activa y especificidad de escisión de las enzimas específicas para enfermedad seleccionada (véase, por ejemplo, tecnologías establecidas por VectraMed, Plainsboro, NJ). Tales ligadores pueden usarse en la modificación de los péptidos descritos en el presente documento para administración terapéutica.

20 **[0105]** Por supuesto, debe entenderse que los péptidos inhibidores pueden formar parte de una pauta terapéutica en la que el tratamiento basado en péptidos inhibidores se usa en combinación con una pluralidad de otras terapias para el trastorno dado. Como tal, la terapia de combinación se contempla específicamente.

## EJEMPLOS

30 **[0106]** La presente invención se explica adicionalmente por los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse a modo de limitar el alcance de la presente invención.

### EJEMPLO 1

#### Síntesis y caracterización de inhibidores de MLCK

##### A. Síntesis de L- y D- péptidos

40 **[0107]** Los inhibidores de péptidos se evaluaron para actividad inhibidora de MLCK. Los inhibidores de péptidos mostrados en la Tabla 2 se sintetizaron como se describe más adelante.

Tabla 2

Secuencia	Designación
Arg-Lys-Lys-Tyr-Lys-Tyr-Arg-Arg-Lys	PIK (SEQ ID NO: 12)
arg-lys-lys-tyr-lys-tyr-arg-arg-lys	D-PIK
lys-arg-arg-tyr-lys-tyr-lys-lys-arg	D-PIK (invertida)
Arg-Lys-Lys-tyr-lys-tyr-Arg-Arg-Lys	D-PIK (int.)
Aminoácidos que empiezan con una letra en mayúscula designan L-aminoácidos.	
Aminoácidos que empiezan con una letra en minúscula designan D-aminoácidos.	

50 **[0108]** Se sintetizaron péptidos por técnicas de síntesis de péptidos en fase sólida usando química de Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) usando un sintetizador de péptidos Symphony Quartet automatizado (Zinsser analytic, Maidenhead). Los grupos guanilo de arginina se protegieron por 2,2,4,6,7-pentametildihidrobenzofuran-5-sulfonilo; las cadenas laterales de lisina y tirosina se protegieron por terc-butoxicarbonilo y terc-butilo, respectivamente. Se hincharon 100 mg (0,78 mmol/g) de resina Rink amida MBHA con diclorometano durante 30 minutos. Las desprotección de aminoácidos de Fmoc se llevó a cabo por tratamiento con 20% (v/v) de piperidina/dimetilformamida (DMF) durante 20 min. Se realizaron reacciones de acoplamiento iniciales añadiendo resina/aminoácido/HOBt/PyBOP<sup>®</sup>/N,N-diisopropiletilamina (DIEA) en equivalentes de 1/5/5/4,9/1 0 y mezclando durante 2 horas. Cada reacción de acoplamiento posterior se realizó por escisión de grupos N- $\alpha$ -Fmoc con 20% (v/v)

de piperidina/DMF durante 12 minutos, seguido de mezcla de aminoácidos de Fmoc 0,05 M disuelta en DMF con 0,1 M de HBTU y 0,4 M de 4-metilmorfolina durante 30 min, seguido de lavado de resina en DMF. La acetilación del extremo N se realizó en algunos péptidos antes de la escisión de la resina mediante tratamiento con 50% de anhídrido acético, 25% de piridina y 25% de DMF.

5 **[0109]** Péptidos brutos se escindieron de la resina durante 3 horas en 95% de ácido trifluoroacético (TFA), 2,5% de triisopropilsilano y 2,5% de H<sub>2</sub>O, se evaporaron en rotovapor para eliminar disolventes, se precipitaron con éter frío, se disolvieron con 2% de acetonitrilo, 2% de ácido acético y luego se liofilizaron. La purificación de péptidos deseados del material bruto se logró por HPLC semi-preparativa usando una columna de gel de sílice de fase  
10 inversa Vydac 218TP C18 (10 x 250 mm, tamaño de poro 300 Å, tamaño de partícula 5 µm). Las mezclas brutas se separaron usando un gradiente del 2% de B al 50% de B en 20 min (velocidad de flujo = 1 ml/min) cuando el eluyente A fue 0,3% de TFA en agua y el eluyente B fue 0,3% de TFA en acetonitrilo. La separación de las mezclas de péptidos brutas se monitorizó a 280 nm. Las fracciones de péptidos recogidas se reunieron, se concentraron y se verificaron por separación en cromatografía de líquidos y análisis de espectrometría de masas (CL-EM). La  
15 separación por HPLC de péptidos se realizó en una columna de sílice de fase inversa 218TP C18 (4,6 x 250 mm, tamaño de poro 300 Å, tamaño de partícula 5 µm) usando un gradiente del 2% de B al 50% de B en 20 min (velocidad de flujo = 0,5 ml/min) cuando el eluyente A fue 0,1% de TFA en agua y el eluyente B fue 0,1% de TFA en acetonitrilo. Los péptidos se monitorizaron a 280 nm y se realizó ionización por electropulverización positiva usando un espectrómetro de masas (EM) Thermo Finnigan LCQ™ DECA y se analizaron usando el software Thermo Finnigan Xcalibur™ (Thermo Separation Products, Riveria Beach, FL).  
20

#### B. Los inhibidores de péptidos inhiben MLCK en un ensayo de cinasa *in vitro*

25 **[0110]** La capacidad de un péptido para inhibir MLCK se determinó según Zolotarevsky y col., (2002) Gastroenterology 123:163-172. Brevemente, monocapas de Caco-2 confluentes que expresan la MLCK de 215 kDa se usaron como fuente de MLCK. Las monocapas se recogieron en tampón de lisis (MOPS 20 mM a pH 7,4, 0,5% de Triton X-100 (detergente no iónico), 0,5% de NP-40, DTT 1 mM) con inhibidores de proteasa y se diluyeron a 0,1 mg/ml en tampón de reacción de cinasa (MOPS 20 mM, pH 7,4; MgCl<sub>2</sub> 2 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,25 mM; y calmodulina 0,2 µM).

30 **[0111]** Sobre hielo, PIK (SEQ ID NO: 12) se diluyó a diversas concentraciones (0, 1, 10, 33, 100 y 330 µM) en tampón de reacción de cinasa (20 mmol/l de ácido morfolinopropanosulfónico, pH 7,4; 2 mmol/l de MgCl<sub>2</sub>; 0,25 mmol/l de CaCl<sub>2</sub>; y 0,2 µmol/l de calmodulina), y la reacción se inició mediante la adición de γ<sup>32</sup>P-ATP (ICN, Costa Mesa, CA) y 5 µmol/l de MLC recombinante. Entonces, las mezclas se transfirieron de hielo a 30°C durante 5 a 30 minutos, de forma que el ensayo estuvo en el intervalo lineal. La fosforilación de MLC se determinó por  
35 autorradiografía de mezclas de reacción separadas por SDS-PAGE.

**[0112]** La adición de SEQ ID NO: 12 produjo una inhibición dependiente de dosis de la actividad de cinasa MLC de Caco-2 con una CI<sub>50</sub> de 29 µmol/l.

#### 40 C. Los inhibidores son permeables a la membrana

**[0113]** La permeabilidad de la membrana se determina usando un ensayo descrito en Zolotarevsky y col. Gastroenterology 123:163-172, (2002). Brevemente, se sintetizan péptidos para incluir D-biotina (Sigma, St. Louis, MO) en el extremo amino usando un sintetizador de péptidos Pioneer automatizado (Applied Biosystems, Foster City CA). Monocapas de Caco-2 se incuban con péptido 330 µM en HBSS, se aclaran para eliminar péptido extracelular y se fijan con 1% de paraformaldehído. Entonces, las células se permeabilizan con 0,1% de Triton X-100 en solución salina tamponada con fosfato (PBS) o no se permeabilizan. El péptido biotinilado se detecta por incubación con estreptavidina conjugada con Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, OR) en PBS con 1% de albúmina de suero bovino. Las monocapas teñidas se montan en reactivo SlowFade (Molecular Probes) y se examinan por microscopía  
45 de epifluorescencia. La permeabilidad de la membrana se indica por un anillo circunferencial brillante que delinea cada célula en preparaciones permeabilizadas, pero no en preparaciones no permeabilizadas.  
50

#### D. Los inhibidores inhiben MLCK en una célula

55 **[0114]** Se usó resistencia transepitelial (RTE), un marcador sensible de permeabilidad de la zona de oclusión (ZO), para medir la actividad de MLCK dentro de células.

**[0115]** Los inhibidores pueden prevenir la contracción de actomiosina o inducir la relajación de actomiosina en las células. El efecto de MLCK sobre la contracción de actomiosina produjo una disminución en la RTE de células cultivadas en cultivo. Células Caco-2 que expresan SGLT1 se mantuvieron y se cultivaron como monocapas polarizadas sobre soportes de membrana de policarbonato de tamaño de poro de películas de 0,4 µm recubiertas con colágeno Transwell (Corning-Costar, Cambridge, MA). Las monocapas se incubaron con 500 µM de PIK, D-PIK, D-PIK (invertida) o D-PIK (int.) durante una hora, después de lo cual se midió la resistencia transepitelial (RTE). Las mediciones electrofisiológicas se hicieron usando puentes de agar con electrodos de calomelanos de Ag-AgCl y una  
60

pinza de voltaje (Universidad de Iowa, Bioingeniería, Iowa City, IA). Corrientes de 50  $\mu$ A fijas se pasaron a través de las monocapas de Caco-2 permitiendo que la RTE se calculara usando la ley de Ohm. La resistencia del líquido se restó de todos los valores antes del posterior análisis.

5 **[0116]** La Tabla 3 indica que los péptidos probados permearon las células y pudieron inhibir MLCK. Además, la sustitución de los L-aminoácidos con D-aminoácidos tuvo muy poco efecto sobre la capacidad del péptido para inhibir MLCK.  $\Delta$  RTE indica la elevación en RTE con respecto a monocapas de Caco-2 de control. También D-PIK y D-PIK (invertida) produjeron ambos aumentos similares en la RTE a medida que se acetiló PIK cuando se comparó con monocapas de control, a concentraciones de hasta 1 mM. Estos resultados demuestran que análogos de  
10 inhibidores producidos usando D-aminoácidos pueden producir la misma inhibición fisiológica de MLCK que aquella producida usando L-aminoácidos y que los inhibidores que contienen D-aminoácidos son permeables a la membrana de un modo similar a PIK.

15 **Tabla 3**

Inhibidor	$\Delta$ RTE
PIK (SEQ ID NO: 12)	45% +/- 5%
D-PIK	41% +/- 9%
D-PIK (invertido)	50% +/- 9%
D-PIK (int.)	47% +/- 11%

15 E. Especificidad de análogos de PIK

20 **[0117]** Junto con MLCK, PKA y CaMPKII son dos otras serina/treonina cinasas que interactúan con rutas mediadas por calmodulina. Para que los inhibidores de MLCK estables sean útiles *in vivo* es importante que también inhiban selectivamente sólo MLCK.

25 **[0118]** Se determinó la actividad de proteína cinasa (PKA) dependiente de cAMP usando un kit de ensayo de proteína cinasa no radiactiva añadiendo 20 unidades de PKA a 0,5, 1, 2,5 y 5 mM de péptidos inhibidores de MLCK y siguiendo las instrucciones del fabricante. El inhibidor de proteínas cinasas 6-22 amida se usó como control positivo.

30 **[0119]** La actividad de proteína cinasa II dependiente de calcio/calmodulina (CaMPKII) se determinó usando un pseudo-sustrato de péptido (Biotina-PLSRTLVSSS-NH<sub>2</sub>) preparado por síntesis de péptidos en fase sólida de Fmoc como se describe previamente (13). Pseudo-sustrato biotilado (0,5  $\mu$ g/ml en PBS) se fijó en pocillos de placas de microtitulación de poliestireno de 96 pocillos previamente recubiertos con 100  $\mu$ l de estreptavidina (3  $\mu$ g/ml en PBS) mediante incubación durante la noche a 4°C. Entonces, los pocillos se lavaron 3 veces con 100  $\mu$ l de TBS (PBS que contienen 0,05% de Tween-20) para eliminar el péptido del pseudo-sustrato sin unir. Se mezcló CaMPKII (20 unidades) con 0, 0,5, 1, 2,5 o 5 mM de un péptido inhibidor de MLCK en 108  $\mu$ l de tampón de reacción de  
35 CaMPKII (Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, ditiotreitól mM, Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM, 100  $\mu$ l de ATP, calmodulina 1,2  $\mu$ M y CaCl<sub>2</sub> 2 mM). Después de una pre-incubación de 5 min a 30°C, 12  $\mu$ l de muestra del inhibidor de cinasa MLCK se añadieron a pocillos recubiertos con pseudo-sustrato junto con 100  $\mu$ l de tampón de reacción CaMPKII. Después de 20 min de incubación a 30°C se añadieron 100  $\mu$ l de 20% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y los pocillos se lavaron 5 veces con PBS. El pseudo-sustrato fosforilado se determinó usando un anticuerpo anti-fosfoserina monoclonal biotilado (100  $\mu$ l del clon PSR-45, diluido 1/50.000 en PBS), seguido de la aplicación de estreptavidina conjugada con peroxidasa y medición de la conversión de o-fenilendiamina (0,5 mg/ml) (leída a 492 nm).

40 **[0120]** Ni D-PIK ni D-PIK (invertida) ni D-PIK (int) demostraron notables efectos inhibidores hacia PKA o CaMPKII a concentraciones de hasta 5 mM. Por tanto, tanto D-PIK como D-PIK (invertida) pueden inhibir específicamente MLCK, sin afectar actividades de PKA o CaMPKII.  
45

F. Susceptibilidad de inhibidores de péptidos a proteasas intestinales

50 **[0121]** Los péptidos administrados *in vivo* son susceptibles a la escisión de proteasas, particularmente aquellos administrados al intestino. PIK, D-PIK, D-PIK (invertida) y D-PIK (int.) se incubaron cada una con líquido intestinal de rata y también con extractos de células epiteliales intestinales Caco-2 que contenían una mezcla de proteasas del borde en cepillo y citosólicas. Se obtuvieron secreciones intestinales lumbales lavando los intestinos de rata aislados (duodeno al íleon) con 10 ml de 20 mM de tampón ácido N-2-hidroxietilpiperazin-N'-2-etanosulfónico (HEPES), pH 7,4. Los contenidos descargados se centrifugaron para eliminar los sólidos y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0,20  $\mu$ m antes de determinar el contenido total de proteína. Células Caco-2 confluentes se aclararon con PBS, se elevaron por un breve tratamiento con tripsina en un pequeño volumen de medio Eagle modificado con Dulbecco (DMEM) y se lavaron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS). El sedimento de células final se re-suspendió en un pequeño volumen de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, EDTA 2 mM, 20% de glicerol a pH 7,4) y se sonicó sobre hielo. Las concentraciones de proteína del líquido intestinal aislado  
55

y extractos de células Caco-2 lisadas se determinaron usando el ensayo de proteínas Bio-Rad. Inhibidores de péptidos de MLCK (1 mg/ml) en PBS se mezclaron con 0,1 mg de proteína de secreciones intestinales o lisado de células Caco-2 sobre hielo y se incubaron durante 4°C y 37°C, respectivamente. En momentos seleccionados se extrajeron alícuotas de 100 µl y se mezclaron con un volumen igual de 0,5% de TFA (en 50/50 de agua/acetonitrilo) para terminar las reacciones enzimáticas. Las muestras se centrifugaron y los sobrenadantes se analizaron por análisis de CL-EM para determinar el patrón de escisión de PIK.

**[0122]** El contenido de péptido residual se evaluó por cromatografía líquida-espectrometría de masas (Tiller y col., Anal Bioanal Chem 2003; 377:788-802) e ionización por electropulverización de ión positivo. En presencia de líquido intestinal de rata, enlaces peptídicos en los lados del extremo C de residuos K y R de PIK se escindieron inicialmente, en sitios característicos de endopeptidasas similares a tripsina. Las incubaciones extendidas en líquido intestinal de rata conducen a la hidrólisis total de PIK. Los extractos de células epiteliales intestinales Caco-2 escindieron PIK a través de la secuencia palindrómica central y sugirieron la presencia de una endopeptidasa similar a quimotripsina.

**[0123]** Los péptidos enumerados en la Tabla 2 (0,1 mg) se incubaron con líquido intestinal de rata (0,2 mg) a 37°C durante 0,5 min a 6 horas. Los resultados se proporcionan en la Tabla 3 a  $t_{1/2}$ .

**Tabla 3**

Inhibidor	$t_{1/2}$
PIK	0,2 min
D-PIK	3,6 horas
D-PIK (invertido)	13,4 horas
D-PIK (int.)	0,2 min

**[0124]** Como se demuestra en la Tabla 3, los péptidos inhibidores que contienen todos los D-aminoácidos fueron significativamente más resistentes que un péptido que tiene la misma secuencia, pero que contiene todos los L-aminoácidos. Sorprendentemente, el péptido que contiene todos los D-aminoácidos y la secuencia inversa del péptido inhibidor que contiene L-aminoácidos demostró incluso mayor resistencia sin la pérdida de actividad inhibidora (Tabla 3).

## EJEMPLO 2

### Células infectadas por *Escherichia coli* enteropatógena resisten la rotura tras el tratamiento con un inhibidor de MLCK

**[0125]** Este ejemplo muestra la eficacia del inhibidor de D-PIK (invertida) de MLCK en prevenir la rotura de la zona de oclusión que se produce tras la infección con bacterias enteropatógenas.

**[0126]** Células T<sub>84</sub> (células epiteliales intestinales humanas polarizadas) se cultivaron en una mezcla 1:1 (vol/vol) de medio Eagle modificado con Dulbecco-Vogt (Invitrogen, Carlsbad, CA) y Hams F-12 (Invitrogen) con 6% de suero de ternero recién nacido (Invitrogen) a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>. Células Caco-2 se cultivaron en medio Eagle modificado con Dulbecco-Vogt con alto contenido de glucosa complementado con 10% de suero bovino fetal (Invitrogen) a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>.

**[0127]** Monocapas de T<sub>84</sub> y Caco-2 se infectaron cada una con la cepa E2348/69 de *E. coli* enteropatógena (EPEC) a una multiplicidad de infección (MOI) de 100. Después de 1 hora, el medio se aspiró y se sustituyó.

**[0128]** Monocapas de control, infectadas con EPEC, e infectadas con EPEC + D-PIK (invertida) de células T<sub>84</sub> y Caco-2 se fijaron sobre cubreobjetos de vidrio con 3,7% de paraformaldehído y luego se permeabilizaron con 0,2% de Triton X-100 durante 15 minutos. Las células se incubaron con 2,5% de albúmina de suero bovino durante 1 hora y luego con anticuerpo primario contra ocludina durante 1 hora seguido de anticuerpo secundario conjugado con isotiocianato de rodamina o fluoresceína durante 1 hora. Las monocapas se lavaron y se montaron sobre portaobjetos de microscopio de vidrio con reactivo Antifade (Molecular Probes, Eugene, OR). Las monocapas teñidas se visualizaron y se fotografiaron con un microscopio invertido Nikon Opti-Phot equipado con el sistema de obtención de imágenes digitales Spot-RT (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI). La resistencia eléctrica transepitelial se midió cuatro horas tras la infección con EPEC. D-PIK (invertida) se administró a 30, 100 y 300 µmol/l.

**[0129]** La visualización de las células reveló que D-PIK (invertida) previno la redistribución de la proteína transmembrana de la zona de oclusión ocludina tras la infección por EPEC. D-PIK (invertida) también previno una disminución en la resistencia eléctrica transepitelial en células infectadas por EPEC. Por tanto, los péptidos inhibidores de D-PIK (invertida) pueden tener uso terapéutico contra bacterias enteropatógenas.

## EJEMPLO 3

**El inhibidor de péptidos de MCLK es eficaz en invertir diarrea aguda dependiente de TNF mediada por linfocitos T**

**[0130]** Este ejemplo demuestra que los inhibidores de MLCK resistentes a proteasa son eficaces *in vivo* en el tratamiento de una enfermedad asociada a actividad de MLCK. En este ejemplo, la enfermedad es diarrea aguda mediada por la activación de linfocitos T. La eficacia del péptido se determina midiendo la secreción del líquido neta y el flujo de sangre con respecto a luz de proteína del suero.

**[0131]** La permeabilidad intestinal del intestino delgado *in vivo* se determinó en ratones de control y ratones inyectados con anticuerpos anti-CD3 90 minutos antes del ensayo. Ratones hembra C57BL/6, MLCK<sup>-/-</sup> (45) de 210kD o ΔF508 CFTR (36) naturales de 7-10 semanas de edad ayunaron durante 12 ó 24 horas antes del estudio y se inyectaron intraperitonealmente con 200 μg de anti-CD3 (clon 2C11) en 200 μl de PBS o vehículo solo. Entonces, los ratones se usaron para ensayos de permeabilidad intestinal o se sacrificaron para la recogida de tejido. Los tejidos recogidos se congelaron criogénicamente en OCT para inmunofluorescencia, se dispusieron en Trizol (Invitrogen) para análisis de ARNm o se usaron para el aislamiento de células epiteliales, como se describe más adelante. Todos los experimentos en animales se llevaron a cabo según las pautas del Instituto nacional de salud con protocolos autorizados por el Comité institucional para el cuidado y uso de los animales en la Universidad de Chicago. Ensayo de permeabilidad intestinal. La permeabilidad intestinal y el flujo de agua se midieron adaptando un ensayo *in vivo* previamente usado en ratas. Ratones hembra de 7-9 semanas de edad ayunaron durante 24 horas antes del experimento. La anestesia se indujo 1 hora después del tratamiento con anti-CD3 o vehículo con ketamina (75 mg/kg, inyección intraperitoneal, Fort Dodge) y xilazina (25 mg/kg, inyección intraperitoneal, Lloyd Laboratories). Los ratones se inyectaron intravenosamente o retroorbitalmente con 250 μl de 1 mg/ml de albúmina de suero bovino conjugada con Alexa 488 (Molecular Probes) y se indujo la anestesia. El abdomen se abrió por una incisión en la línea media y un asa de 4-5 cm de yeyuno se canuló en los extremos proximales y distales con tubo de polietileno de 0,76 mm de diámetro interno. La disolución de lavado (NaCl 140 mM, HEPES 10 mM, pH 7,4) calentada a 37°C se perfundió primero a través del asa yeyunal a 1 ml/min durante 10 minutos usando una bomba peristáltica (BioRad). Esto fue seguido de perfusión de 5 ml de la disolución de prueba (NaCl 50 mM, HEPES 5 mM, ferrocianuro de sodio 2 mM, KCl 2,5 mM, glucosa 20 mM, pH 7,4) en un modo recirculante a 1 ml/min durante 3 horas, empezando 90 minutos después de tratamiento con anti-CD3 o vehículo. La cavidad abdominal se cubrió con gasa humedecida y la temperatura corporal, medida por termómetro rectal, se mantuvo a 37°C usando una lámpara de calentamiento. Para experimentos que implican perfundido sin Na<sup>+</sup>, el NaCl se sustituyó por N-metil-D-glucamina-Cl. Alternativamente se añadieron inhibidores al perfundido, si se requiere, que incluyen D-PIK (invertida) y D-PIK (25-250 μM). Al principio y al final de la perfusión se sacaron alícuotas de 1 ml de disolución de prueba. Después de la perfusión, el animal se sacrificó y el segmento yeyunal perfundido se escindió y se midió la longitud. Entonces, el asa intestinal escindida se congeló criogénicamente en OCT o se usó para el aislamiento de células epiteliales. La concentración de ferrocianuro en el perfundido se midió usando un ensayo colorimétrico previamente descrito (Sadowski y Meddings, Can J Physiol Pharmacol 1993; 71: 835-9). Como el ferrocianuro no puede atravesar zonas de oclusión, su concentración refleja el movimiento del agua dentro o fuera del perfundido luminal. Se midió la concentración de albúmina de suero bovino conjugada con Alexa 488 usando un lector de microplacas (Synergy HT, Bio-Tek Instruments, Inc.) usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. El movimiento de BSA en el perfundido luminal se determinó por fluorescencia cuantitativa usando una longitud de onda de excitación de 485 nm y una longitud de onda de emisión de 528 nm. El análisis de SDS-PAGE cuantitativo preliminar mostró que la fluorescencia de Alexa 488 representó con exactitud el contenido de albúmina de suero bovino intacta en el perfundido luminal. La eliminación de sonda se calculó como:  $C_{sonda} = (C_i V_i - C_f V_f) / (C_{avg} T L)$ ; el flujo de agua se calculó como:  $(V_i - V_f) / (T L)$ . En estas ecuaciones,  $C_i$  es la concentración de sonda inicial medida;  $C_f$  es la concentración de sonda final medida;  $V_i$  es el volumen de perfundido inicial medido;  $V_f$  se calcula como  $V_i ([ferrocianuro]_i / [ferrocianuro]_f)$ ;  $C_{avg}$  se calcula como  $(C_i - C_f) / \ln(C_i / C_f)$ ;  $T$  es horas de perfusión; y  $L$  es la longitud de la sección yeyunal perfundida en cm.

**[0132]** Se encontró que el tratamiento con anti-CD3, que produce diarrea aguda mediada por TNF en estos animales (Musch y col. J Clin Invest 2002; 110:1739-47) se asociaba a secreción de líquido neta, en vez de a absorción. La inyección de anticuerpos anti-CD3 en ratones hizo que el líquido entrara en el intestino delgado, mientras que los ratones de control que no recibieron anticuerpos anti-CD3 absorbieron el líquido del intestino delgado. La activación de linfocitos T sistémica inducida por la administración de anticuerpos anti-CD3 produjo diarrea aguda en ratones. La inducción de diarrea por citocinas en respuesta a la administración de anticuerpos anti-CD3 se confirmó midiendo un aumento en los transcritos de interferón- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  de mucosa y en la relación de peso con respecto a longitud del intestino delgado. También estuvieron presentes pruebas macroscópicas de la inflamación intestinal, que incluyen vasodilatación, inyección y edema. Por tanto, la inyección de anti-CD3 fue un medio eficaz de inducción de una diarrea aguda autolimitada inmunomediada en ratones.

**[0133]** La administración de un inhibidor de péptidos de MLCK, D-PIK (invertida), a diferentes concentraciones (25, 80 y 250 μmolar) redujo o invirtió el efecto del anticuerpo anti-CD3 en ratones en un modo dependiente de la

dosis. La inyección de anticuerpos anti-CD3 en ratones produjo un aumento en la fuga de proteínas de la sangre en la luz intestinal. En este ejemplo, albúmina de suero bovino (BSA) fluorescentemente marcada inyectada en la corriente sanguínea se recuperó en la luz del intestino delgado. La activación de linfocitos T con anti-CD3 aumentó la cantidad de fuga de BSA en comparación con ratones de control que no recibieron anticuerpos anti-CD3. La administración de D-PIK (invertida) a diferentes concentraciones (25, 80 y 250  $\mu$ molar) redujo o previno el efecto del anticuerpo anti-CD3 en el nivel de BSA en el intestino en un modo dependiente de la dosis. Cuando D-PIK (inversa) se incluyó en el perfundido luminal a las concentraciones indicadas se observó una inversión dependiente de la dosis de la secreción de líquido y fuga de proteína. Estos datos indican que el inhibidor de péptidos puede invertir tanto los defectos de la permeabilidad intestinal como la diarrea *in vivo*.

**[0134]** La corroboración de la capacidad de D-PIK (invertida) para invertir la secreción de líquido neta y el flujo de sangre con respecto a la luz de BSA en células tratadas con anti-CD3 se proporciona en las siguientes observaciones. Primero, la diarrea y los defectos de barrera asociados a la activación de linfocito T sistémica no fueron debidos a la malabsorción de  $\text{Na}^+$  o secreción de  $\text{Cl}^-$ . El bloqueo de la absorción de  $\text{Na}^+$  dependiente de NHE2 y NHE3 en ausencia de tratamiento con CD3 no invirtió el movimiento de agua neto para producir la secreción ni produjo el aumento de flujo paracelular de BSA. Ratones mutantes para el transportador de cloruro CFTR (CFTR $\Delta$ F508) mostraron la misma secreción de líquido neta y flujo de sangre con respecto a luz de BSA que los ratones naturales tras el tratamiento con CD3. En segundo lugar, la disfunción de la barrera producida por el tratamiento con CD3 no fue debida a la ulceración de la mucosa o apoptosis epitelial, sino que se produjo en presencia de una capa epitelial intacta. En tercer lugar, la distribución de la proteína de la zona de oclusión ocludina en tejido *in vivo* se alteró, y la proteína de la zona de oclusión de las placas citoplásmicas ZO-1 se visualizó como más delgada y más sinuosa tras el tratamiento con anti-CD3. En cuarto lugar, los cambios en la morfología de la zona de oclusión y el citoesqueleto de la periunión podrían observarse en ratones tratados con anti-CD3, que mostraron un aumento de la densidad citoplásmica que rodeaba la zona de oclusión, de acuerdo con la condensación de citoesqueletos. En quinto lugar, la fosforilación de la cadena ligera de miosina, como se detecta por inmunofluorescencia y por inmunotransferencia de SDS-PAGE de células epiteliales intestinales aisladas, aumentó más de 3 veces en el anillo de periunión de los enterocitos del vello yeyunal 3 horas después de inyectar ratones con anti-CD3, antes de disminuir: los cambios guardaron relación con el desarrollo y la resolución de diarrea. En sexto lugar, los ratones que carecen de MLCK (210 KDa) se protegieron de la diarrea inducida por la inyección de anti-CD3.

**[0135]** En este ejemplo se usó D-PIK (invertida). Sin embargo, se encontró que D-PIK funcionaba de un modo similar y se espera que los inhibidores de MLCK que tienen D-aminoácidos, L-aminoácidos o enlaces no hidrolizables tengan uso en la inversión de diarrea aguda dependiente de TNF mediada por linfocitos T:

#### **EJEMPLO 4**

##### **El inhibidor de péptidos de MCLK inhibe el crecimiento de bacterias y es bactericida**

**[0136]** Cultivos líquidos de la cepa JM109 lab de *E. coli* o cepa de *E. coli* de ATCC 35150 (0157 hemolítica) se cultivaron hasta fase semilogarítmica. El péptido de D-PIK (inverso), o un péptido mixto de L, se añadieron a concentraciones finales de cero a 200  $\mu$ M, y la densidad óptica a 600 nm se midió en diversos momentos de tiempo usando un espectrofotómetro. El péptido mixto de L contuvo el mismo número de residuos de aminoácidos, y comprendió el mismo contenido de aminoácidos que D-PIK (inversa), pero los aminoácidos del péptido mixto de L fueron isoformas de L y estuvieron en un orden mezclado al azar. El crecimiento de JM109 se inhibió a 150 ó 200  $\mu$ M por D-PIK (inversa) o péptido mixto de L, con hasta una disminución de 5,5 veces en la densidad óptica durante varias horas. *E. coli* hemolítica 0157 mostró una D-PIK (inversa) dependiente de la dosis, pero no inhibición del crecimiento de péptido mixto de L durante la noche. Las unidades formadoras de colonias se determinaron a partir de diluciones seriadas de los cultivos tratados con D-PIK (inversa), se incubaron sobre placas después de 21 horas después de la administración del inhibidor. Se mostró que la turbidez del cultivo más baja era un buen marcador para la inhibición del crecimiento por el ensayo de unidades formadoras de colonias. De los cultivos tratados con D-PIK (inversa) 100 y 200  $\mu$ M, *E. coli* de JM109 mostró una destrucción de 2 logaritmos o superior en comparación con células sin tratar o tratadas con mixto de L.

**[0137]** Células JM109 tratadas con D-PIK (inversa) se incubaron con dos tinciones nucleares, SYTO 9 y yoduro de propidio. Las células permeabilizadas permiten que el yoduro de propidio entre cuando extingue la señal de SYTO9. Las células tratadas tanto se visualizaron por microscopía de fluorescencia como la fluorescencia se cuantificó por fluoroespectrofotometría. La cuantificación de la muerte celular a D-PIK 200  $\mu$ M (inversa) reveló que menos del 10% de las células estuvieron vivas después de 15 minutos de tratamiento, demostrando el modo de acción bactericida de D-PIK (inversa). La microscopía de células tratadas con D-PIK (inversa) reveló grandes aglomeraciones de bacterias con células vivas rodeando un núcleo muerto, que sugiere un defecto de la división celular mediada por D-PIK (inversa) (mediante la inhibición de un homólogo de miosina) que previene que generaciones más jóvenes se separen de sus predecesores de división. La microscopía fluorescente de JM109 tratadas con D-PIK (inversa) biotinilada mostró que D-PIK (inversa) se localiza tanto en tabiques de división celular como en agrupaciones periféricas.

[0138] Para la microscopía electrónica, *E. coli* de JM 109 se trataron con D-PIK biotinilada 50  $\mu\text{M}$  (inversa), se fijaron durante 15 min o 2 h en tanto 2% de paraformaldehído/1% de glutaraldehído como fijador de peryodato-lisina-paraformaldehído y se trataron con Alexa Fluor®\* 594 FluoroNanogold. Después de la visualización por microscopía fluorescente y después de la fijación con 1% de glutaraldehído durante 1 hora, las muestras se revelaron por precipitación con plata hasta que se visualizó por microscopía de luz que una muestra era de color marrón. La microscopía electrónica mostró la unión de D-PIK (inversa) a tanto la membrana externa/periplasma como al citoplasma cortical. El potenciamiento citoplásmico mostró proximidad de D-PIK (inversa) a filamentos.

[0139] En este ejemplo se usó D-PIK (invertida). Sin embargo, se encontró que D-PIK, PIK y D-PIK (int) servía de un modo similar. Se espera que los inhibidores de MLCK tengan D-aminoácidos, o enlaces no hidrolizables tendrían uso en inhibir el crecimiento o en la destrucción de bacterias.

## EJEMPLO 5

### El inhibidor de péptidos de MCLK regula la contracción del anillo de actina durante el cierre de heridas en bolsa de tabaco

[0140] En este ejemplo se prevé que un inhibidor que comprende un D-aminoácido o un enlace no hidrolizable funcione de la misma forma que un péptido que comprende L-aminoácidos.

#### A. Materiales y procedimientos

[0141] Células Caco-2 BBe que expresan una proteína de fusión EGFP- $\beta$ -actina se mantuvieron y se cultivaron monocapas sobre placas de cultivo celular de 35 mm recubiertas con colágeno de rata. Las placas se colocaron sobre una pletina calentada a 37°C en HBSS tamponado con HEPES a pH 7,4 (sin bicarbonato) durante la creación de heridas y posterior obtención de imágenes. Las monocapas se trataron con Y-27632 10  $\mu\text{M}$  (Calbiochem, San Diego, CA) o PIK 250  $\mu\text{M}$ , antes de la creación de heridas. Las heridas se crearon manualmente usando un alambre de tungsteno de 0,003 de calibre.

[0142] Se obtuvieron imágenes del cierre de heridas en células vivas usando un microscopio de epifluorescencia equipado con un cubo de emisión de paso de banda Endow GFP y cámara Roper Coolsnap HQ controlada por MetaMorph 6 (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA). Se obtuvieron imágenes de pila Z seriadas, a intervalos de 1  $\mu\text{m}$ , cada 2 min después de la creación de heridas. Se obtuvieron imágenes de las heridas fijadas después de la tinción usando un conjunto de filtro cuádruple 88000 (Chroma Technology). Las áreas de herida se determinaron usando MetaMorph 6 después de trazar manualmente el borde de la herida. Las intensidades de píxeles se determinaron con MetaMorph 6 usando muestras iguales teñidas y de las que se obtuvieron imágenes bajo condiciones idénticas. Para estos análisis se representaron las intensidades de píxeles a lo largo de las líneas perpendiculares al borde la herida. La intensidad del pico de actina, correspondiente al anillo de actina en desarrollo o establecido, se usó para alinear múltiples líneas y se designó arbitrariamente 0. Estos análisis se realizaron para múltiples heridas.

[0143] Las heridas se fijaron en 1% de paraformaldehído en PBS en momentos indicados después de la creación de heridas. Los sitios de herida se marcaron estereotácticamente para ayudar en la identificación de heridas específicas después de la tinción. Después de la permeabilización con 0,1% de Triton X-100 se aplicaron anticuerpos específicos. Rho activado se detectó por incubación con una proteína de fusión del dominio de unión a GSTrhotekin rho (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY), seguido de incubación con anti-GST de cabra policlonal y luego IgG de mono anti-cabra conjugado con Alexa 594. Los experimentos de control mostraron que la sustitución de GSTrhotekin con una proteína de fusión de GST irrelevante no marcó el borde de la herida, pero marcó no específicamente células muertas/lesionadas dentro de la herida. ROCK se marcó usando un anticuerpo anti-ROCK-I/ROK- $\beta$  monoclonal de ratón (Becton-Dickinson), seguido de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con Alexa-594. MLCK se detectó usando el clon K-36 anti-MLCK monoclonal de ratón (Sigma, St. Louis, MO), seguido de anticuerpo de cabra dirigido contra IgG de ratón conjugada con Alexa-594. MLC fosforilada se detectó usando antisueros de conejo policlonales purificados por afinidad, seguido de anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado con Alexa-350 (Molecular Probes). En preparaciones fijadas, la F-actina se tiñó usando Alexa-488-faloídina. MLCK activa se detectó usando PIK biotinilada y Alexa-594-estreptavidina. El marcado del inhibidor se evaluó cuantitativamente usando un lector de microplacas fluorescente.

[0144] Los ensayos de cinasa se realizaron como se ha descrito en el Ejemplo 1 usando cinasa MLC larga de células Caco-2 y MLC epitelial intestinal recombinante. Se añadió PIK o vehículo a mezclas de reacción y la reacción se inició mediante la adición de  $\gamma$ 32P-ATP y MLC recombinante 5  $\mu\text{M}$ . La fosforilación de MLC se determinó por autorradiografía de SDS-PAGE de mezclas de reacción.

## B. Resultados

**[0145]** Cuando la fase de contracción del cierre de heridas empezó en células epiteliales intestinales Caco-2, MLC fosforilada se co-localizó con el anillo de actomiosina contrayente y MLCK decoró el anillo de actomiosina en un patrón punteado. La activación de MLCK en el sitio de herida se mostró usando una sonda de PIK morfológica desarrollada para ser específica para MLCK activada. Se encontró que PIK se unía a MLCK activa, pero no inactiva, fijada en aldehído y una sonda de péptido de PIK biotinilada permitió la localización de la unión de PIK usando conjugados de estreptavidina fluorescente. Se probó la eficacia de la sonda de PIK: la sonda de PIK se unió preferencialmente al anillo de actomiosina de periunión, un sitio enriquecido en MLC fosforilada por MLCK, y la inducción graduada de la expresión génica de MLCK en células Caco-2 produjo el aumento del marcado de PIK que guardó estrecha relación con el grado de expresión de la subunidad catalítica de MLCK ( $r^2 = 0,98$ ). Usando la sonda de PIK biotinilada, MLCK activada se detectó cuando la fase de contracción empezó dentro de focos discretos en el borde de la herida. Por tanto, el reclutamiento y la activación de MLCK guarda relación con la contracción durante el cierre de heridas en bolsa de tabaco. Se encontró que un procedimiento dependiente de MLCK similar participaba en la curación de heridas oligocelulares *in vivo*, en biopsias rápidamente fijadas de mucosa colónica humana. Por tanto, el mecanismo de fosforilación de MLC de cierre de heridas es activo *in vivo*.

**[0146]** La inhibición por PIK de MLCK no previno el ensamblaje del anillo de actomiosina, pero hizo que se estancara la contracción del ensamblaje. El anillo de actina empezó a fragmentarse, los bordes de las heridas se volvieron irregulares en vez de redondeados y la herida volvió a su área original. Por tanto, PIK puede usarse para regular la contracción durante el cierre de heridas en bolsa de tabaco. Un análisis del cierre de heridas en bolsa de tabaco de células individuales también mostró una posible función reguladora para PIK. Las células individuales en una monocapa intacta se destruyeron con un pulso de corriente liberado de un microelectrodo, produciendo una falta de corriente local, cuya magnitud disminuyó exponencialmente a medida que se restauró la barrera. La inhibición de MLCK con PIK produjo un marcado ralentizamiento de la reparación. Entre 2 min y 8 min después de crearse la lesión, la falta de corriente local disminuyó sólo el 36% en comparación con el 53% en monocapas de control. Esto se corresponde con un aumento del 74% en la constante de tiempo para la recuperación. Por tanto, al igual que heridas más grandes, el cierre en bolsa de tabaco de heridas de una sola célula requiere actividad de MLCK, que puede regularse mediante la adición de PIK.

### EJEMPLO 6

#### El inhibidor de péptidos de MCLK inhibe el crecimiento de células tumorales

**[0147]** Tumores de ratones fueron inyectados con solución salina o solución salina más 0,5 mg de D-PIK (inversa) cada dos días. Después de 3 inyecciones, los ratones se sacrificaron y se registró el tamaño de los tumores. Se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en el tamaño del tumor entre los grupos inyectados con solución salina y con D-PIK (inversa). El examen microscópico de secciones de tumores reveló que se había producido necrosis significativa en los tumores que habían sido inyectados con D-PIK (inversa). Se prevé que los inhibidores, particularmente en una forma estable, puedan usarse para tratar terapéuticamente cánceres.

**[0148]** En este ejemplo se usó D-PIK (invertida). Sin embargo, también se encontró que D-PIK, PIK y D-PIK (int) funcionaban de una manera similar. Se espera que los inhibidores de MLCK que tienen D-aminoácidos, L-aminoácidos o enlaces no hidrolizables produzcan necrosis de células tumorales y una reducción en el tamaño del tumor.

### EJEMPLO 7

#### El inhibidor de péptidos de MCLK afecta la migración de células

**[0149]** Se usó una sonda de PIK biotinilada específica para MLCK, descrita en el Ejemplo 5, para determinar si un inhibidor podía servir para inhibir MLCK en células en migración. El péptido de PIK biotinilado permitió la localización de la unión de PIK usando conjugados de estreptavidina fluorescentes. Para confirmar que la sonda de PIK biotinilada funcionó adecuadamente, se mostró que se unía preferencialmente a un sitio enriquecido en MLC fosforilada por MLCK, el anillo de actomiosina de periunión, en monocapas epiteliales intactas. También se mostró que la PIK biotinilada se concentró altamente dentro de lamelipodios en células Caco-2 en migración, demostrando que MLCK se activa en células en migración. Participa una función para los inhibidores en regular la migración de células.

**[0150]** La migración de células se requiere para el desarrollo embrionario, formación de tumores y metástasis. Se prevé que los inhibidores inhiban la migración de células y puedan usarse para tratar terapéuticamente enfermedades que requieren la migración de células, que incluyen cáncer, metástasis y enfermedades relacionadas con tumores, y también para controlar el desarrollo embrionario.

**EJEMPLO 8**

**Tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino**

5 **[0151]** Se realiza un ensayo clínico en el que cinco a cincuenta sujetos se seleccionan para el estudio clínico. Los pacientes padecen enfermedad inflamatoria del intestino. Los sujetos se dividen en dos grupos, uno de los cuales recibe el fragmento de inhibidor como agente activo y el otro recibe un placebo. Los sujetos en el grupo de prueba reciben entre 1 y 3000 mg del fármaco basado en péptido inhibidor por día por la vía oral. Los sujetos se mantienen en esta terapia durante 3-12 meses. Se mantienen registros precisos en cuanto al número y la gravedad de los síntomas en ambos grupos y al final del estudio estos resultados se comparan. Los resultados se comparan tanto entre miembros de cada grupo como también los resultados para cada paciente se comparan con los síntomas informados por cada paciente antes de empezar el estudio. Los resultados demuestran que pacientes en el grupo de prueba tienen molestias intestinales reducidas en comparación con el grupo de control y en comparación con la sintomatología de los miembros de prueba al principio del estudio.

15 **[0152]** Se apreciará que las composiciones farmacéuticas y los procedimientos de tratamiento descritos en el presente documento son útiles en campos de medicina humana y veterinaria. Por tanto, el sujeto que va a tratarse es un mamífero, tal como un ser humano u otro animal mamífero. Para fines veterinarios, los sujetos incluyen, por ejemplo, animales de granja que incluye vacas, ovejas, cerdos, caballos y cabras, animales de compañía tales como perros y gatos, animales exóticos y/o de zoológico, animales de laboratorio que incluyen ratones, ratas, conejos, cobayas y hámsteres; y aves de corral tales como pollos, pavos, patos y gansos. Otros sujetos que van a tratarse incluyen no mamíferos tales como aves, peces, anfibios y reptiles.

25 **[0153]** Aunque la presente invención se ha descrito y ejemplificado ahora con alguna especificidad, aquellos expertos en la materia apreciarán las diversas modificaciones, que incluyen variaciones, adiciones y omisiones que pueden hacerse en lo que se ha descrito. Por consiguiente, se pretende que estas modificaciones también sean englobadas por la presente invención y que el alcance de la presente invención únicamente se limite por la interpretación más amplia que legamente puede conferirse por las reivindicaciones adjuntas.

30 **LISTADO DE SECUENCIAS**

**[0154]**

- 35 <110> UNIVERSIDAD DE CHICAGO
- <120> INHIBIDORES DE CINASA DE LA CADENA LIGERA DE MIOSINA Y PROCEDIMIENTOS DE USO
- <130> 092234-9030-WO00
- 40 <140> Nueva solicitud internacional
- <141> 21/04/2005
- <150> 60/564.313
- 45 <151> 21/04/2004
- <160> 14
- <170> Patentin Versión 3.2
- 50 <210> 1
- <211> 22
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 55 <400> 1

Ala Lys Lys Leu Ser Lys Asp Arg Met Lys Lys Tyr Met Ala Arg Arg  
1 5 10 15

Lys Trp Gln Lys Thr Gly  
20

- 60 <210> 2
- <211> 22

ES 2 400 567 T3

<212> PRT  
<213> ovis aries  
  
<400> 2  
5  
Ala Lys Lys Leu Ser Lys His Arg Met Lys Lys Tyr Met Ala Arg Arg  
1 5 10 15  
Lys Trp Gln Lys Thr Gly  
20  
  
<210> 3  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Tetraodon nigroviridis  
  
<400> 3  
10  
Ala Lys Lys Leu Ser Lys Glu Arg Met Lys Lys Tyr Ile Leu Arg Arg  
1 5 10 15  
Lys Trp Gln Lys Thr Gly  
20  
15  
  
<210> 4  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Carassius auratus  
  
<400> 4  
20  
Val Lys Lys Leu Ser Lys Glu Arg Met Lys Lys Tyr Ile Leu Arg Arg  
1 5 10 15  
Lys Trp Gln Lys Thr Gly  
20  
25  
  
<210> 5  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> canis familiaris  
  
<400> 5  
30  
Ala Lys Lys Leu Ser Lys Asp Arg Met Lys Lys Tyr Met Ala Arg Arg  
1 5 10 15  
Lys Trp Gln Lys Arg Lys  
20  
35  
  
<210> 6  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
40  
  
<220>  
<223> oligonucleótido sintético  
  
<220>  
<221> misc\_feature  
45  
<222> (1)..(1)  
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca naturalmente  
  
<220>  
<221> misc\_feature

ES 2 400 567 T3

<222> (7)..(7)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca naturalmente

5 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (13)..(14)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca naturalmente

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (21)..(22)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca naturalmente

15 <400> 6  
 Xaa Lys Lys Leu Ser Lys Xaa Arg Met Lys Lys Tyr Xaa Xaa Arg Arg  
 1 5 10 15  
 Lys Trp Gln Lys Xaa Xaa  
 20

20 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 7

25 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

30 <210> 8  
 <211> 26  
 <212> PRT  
 <213> factor de crecimiento de fibroblastos del virus de Kaposi

<400> 8

35 Ala Ala Val Ala Leu Leu Pro Ala Val Leu Leu Ala Leu Leu Ala Pro  
 1 5 10 15  
 Val Asn Arg Lys Arg Asn Lys Leu Met Pro  
 20 25

40 <210> 9  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 9

45 Val Thr Val Leu Ala Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly  
 1 5 10 15

50 <210> 10  
 <211> 34  
 <212> PRT  
 <213> dominio de transducción de la proteína VP22 del virus del herpes simple

<400> 10

ES 2 400 567 T3

Asp Ala Ala Thr Ala Thr Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Arg Pro Thr  
 1 5 10 15

Glu Arg Pro Arg Ala Pro Ala Arg Ser Ala Ser Arg Pro Arg Arg Pro  
 20 25 30

Val Glu

5 <210> 11  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Drosophila melanogaster

<400> 11

10 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys  
 1 5 10 15

15 <210> 12  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Oligonucleótido sintético

20 <400> 12

Arg Lys Lys Tyr Lys Tyr Arg Arg Lys  
 1 5

25 <210> 13  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

<400> 13

Lys Arg Arg Tyr Lys Tyr Lys Lys Arg  
 1 5

35 <210> 14  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> oligonucleótido sintético

45 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(9)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se produzca naturalmente

<400> 14

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa  
 1 5

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un inhibidor de cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) que tiene hasta 120 aminoácidos y que comprende SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13, en el que el 100% de los aminoácidos dentro de SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 13 son D-aminoácidos, en el que el inhibidor retiene sustancialmente la misma inhibición fisiológica de MLCK con respecto al mismo inhibidor que tiene todos los L-aminoácidos.
2. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 12.
- 10 3. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que la secuencia de aminoácidos comprende SEQ ID NO: 13.
4. El inhibidor de la reivindicación 1, que comprende además una secuencia que elige como diana el transporte a membrana escindible.
- 15 5. El inhibidor de la reivindicación 1, en el que el inhibidor comprende además un vehículo diana.
6. Una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la reivindicación 1 o la reivindicación 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 7. Un procedimiento para inhibir cinasa de la cadena ligera de miosina en una célula *in vitro* que comprende cinasa de la cadena ligera de miosina que comprende poner en contacto la célula con el inhibidor de la reivindicación 1 en una cantidad eficaz para inhibir la actividad de cadena ligera de miosina cinasa en la célula.
- 25 8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la célula seleccionada es del grupo que consiste en una célula epitelial, una célula endotelial y una célula de músculo liso.
9. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la célula es una célula de mamífero.
- 30 10. La composición farmacéutica de la reivindicación 6 para su uso en un procedimiento para inhibir cinasa de la cadena ligera de miosina en una célula que comprende cinasa de la cadena ligera de miosina, comprendiendo el procedimiento poner en contacto la célula con dicha composición farmacéutica.
- 35 11. El inhibidor de la reivindicación 1 para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno asociado a actividad de MLCK en un mamífero, comprendiendo el procedimiento administrar el inhibidor al mamífero que tiene el trastorno.
- 40 12. El inhibidor de la reivindicación 11 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 11, en el que el trastorno es producido o agravado por contracción de actomiosina mediada por MLCK.
- 45 13. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que el trastorno está seleccionado del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, una enfermedad asociada a una falta vascular o endotelial, una enfermedad asociada a contracción de músculo liso, una enfermedad asociada a migración de células, una enfermedad asociada a angiogénesis, una enfermedad trombótica y una enfermedad asociada a agregación de plaquetas.
- 50 14. El inhibidor de la reivindicación 13 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 13, en el que la enfermedad intestinal está seleccionada del grupo que consiste en enfermedad de injerto frente a huésped, una enfermedad infecciosa, una enfermedad isquémica y una enfermedad inflamatoria.
- 55 15. El inhibidor de la reivindicación 13 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 13, en el que el inhibidor inhibe la migración de una célula.
16. El inhibidor de la reivindicación 15 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 15, en el que la célula es una célula inflamatoria.
- 60 17. El inhibidor de la reivindicación 15 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 15, en el que la célula es una célula de tumor.
18. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que el inhibidor se administra a un mamífero que tiene un tumor, siendo el inhibidor administrado en una cantidad eficaz para inhibir crecimiento tumoral.
19. El inhibidor de la reivindicación 13 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 13, en el que el trastorno es una enfermedad asociada a falta vascular o endotelial.

- 5 20. El inhibidor de la reivindicación 19 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 19, en el que la enfermedad está seleccionada del grupo que consiste en septicemia, choque, anafilaxia y lesión pulmonar aguda.
- 10 21. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que el trastorno es una enfermedad asociada a contracción de músculo liso.
22. El inhibidor de la reivindicación 21 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 21, en el que la enfermedad está seleccionada de asma y enfermedad hipertensiva.
- 15 23. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que se administra una cantidad de inhibidor eficaz para inhibir agregación de plaquetas.
- 20 24. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que se administra una cantidad del inhibidor eficaz para alterar el cierre de heridas en bolsa de tabaco mediado por actomiosina de una célula epitelial.
- 25 25. El inhibidor de la reivindicación 12 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, en el que una cantidad del inhibidor se administra a un mamífero en necesidad de alterar la zona de oclusión epitelial, eficaz para alterar la permeabilidad de la zona de oclusión epitelial.
26. El inhibidor de la reivindicación 25 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 25, en el que la administración del inhibidor invierte una disfunción de la barrera epitelial.
- 30 27. El inhibidor de la reivindicación 26 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 26, en el que la disfunción de la barrera epitelial está asociada a una citocina pro-inflamatoria.
28. El inhibidor de las reivindicaciones 12, 15, 21 ó 23 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 12, 15, 21 ó 23, en el que el inhibidor es para administración por vía oral.
- 35 29. El inhibidor de la reivindicación 14 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 14, en el que la enfermedad intestinal es enfermedad de Crohn.
30. El inhibidor de la reivindicación 14 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 14, en el que la enfermedad intestinal es colitis ulcerosa
- 40 31. Uso de un inhibidor de la reivindicación 1 en la preparación de un medicamento para su uso en un procedimiento para inhibir crecimiento de un tumor, comprendiendo el procedimiento administrar dicho inhibidor al mamífero en una cantidad eficaz para inhibir el crecimiento del tumor.
- 45 32. Un procedimiento *in vitro* para inhibir el crecimiento de una bacteria que comprende administrar a la bacteria el inhibidor de la reivindicación 1.
33. El procedimiento de la reivindicación 32, en el que la bacteria es destruida tras la administración del inhibidor de la reivindicación 1.
34. El inhibidor de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de infección bacteriana.
- 50 35. El inhibidor de la reivindicación 34 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 34 para su uso en el tratamiento de infección por bacterias enteropatógenas.
- 55 36. El inhibidor de la reivindicación 35 para su uso en el procedimiento de tratamiento de la reivindicación 35, en el que la bacteria enteropatógena está seleccionada de la lista que consiste en: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Vibrio cholerae*, *Yersinia*, *Clostridium difficile* y *Shigella flexneri*.
37. Un kit que comprende:  
una composición farmacéutica que comprende el inhibidor de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 60 38. El kit de la reivindicación 37 que comprende además instrucciones para su uso.