

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 459 020**

51 Int. Cl.:

C07K 7/52 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.09.2007 E 07823917 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.01.2014 EP 2081952**

54 Título: **Péptidos**

30 Prioridad:

20.09.2006 GB 0618512

19.04.2007 GB 0707626

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.05.2014

73 Titular/es:

LEXCICON LIMITED (100.0%)
44 ESPLANADE
ST HELIER, JERSEY JE1 3UQ, GB

72 Inventor/es:

NEW, ROGER

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 459 020 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

Péptidos

5 La presente invención se refiere a un oligopéptido cíclico limitado internamente, a una composición farmacéutica que comprende dicho oligopéptido, a usos de dicho oligopéptido y a una composición farmacéutica en medicina y a un procedimiento para producir dicho oligopéptido.

Antecedentes de la invención

10 Se sabe que normalmente los receptores proteicos se unen a sus ligandos diana a través de epítomos, combinaciones de aminoácidos, que constituyen una pequeña proporción de la molécula proteica total.

15 Los receptores proteicos sobre la superficie de células a menudo son estimulados para producir una señal en el interior de la célula como resultado de la unión a otras proteínas, denominadas ligandos proteicos. La porción del ligando que interacciona con el receptor se denomina epítomo y normalmente constituye una combinación de un número pequeño de aminoácidos en estrecha proximidad entre sí, sujeto sobre la estructura de la cadena peptídica. Ejemplos de epítomos son las estructuras sobre la superficie de las proteínas que interaccionan con anticuerpos o con receptores de linfocitos T pero, de hecho, cualquier estructura sobre la superficie de una proteína que es reconocida específicamente por otra puede entrar dentro de la definición de un epítomo. Dado que la unión de un receptor de proteína con un epítomo puede ser una etapa importante en la etiología de una enfermedad o, por el contrario, en el tratamiento de un estado de enfermedad, la identificación de grupos funcionales que forman epítomos es un camino potencialmente fructífera para el desarrollo de nuevos fármacos, cuando el fármaco es un agente que comprende un epítomo que se une al receptor.

25 Existen dos retos que dificultan este abordaje al desarrollo de nuevos fármacos. Uno es la identificación de epítomos que se pueden usar como moléculas farmacológicas para unirse a receptores adecuados con el fin de tratar una enfermedad. El segundo reto es diseñar moléculas que pueden retener y presentar la combinación de aminoácidos que forman el epítomo de forma que se pueda conseguir una fuerte interacción de unión con un receptor celular.

30 Mihara et al, Bull. Chem Soc. Jpn, 65, 228 - 333 (1992) divulgan la síntesis de [ácido L-d-aminomirístico] gramicidina S y su interacción con una bicapa fosfolipídica.

35 Sasaki et al, Peptide Science 1998, 1999, p 421 - 424 divulgan análogos de la gramicidina S portadores de cuatro L-alquilglicinas y dos D-1-naftilaminas.

Nishino et al, Chemistry Letters, pág. 665 - 668, 1992 divulgan un hexapéptido cíclico lipófilo para electrodos selectivos de iones de calcio.

40 Se conocen procedimientos para identificar la combinación de aminoácidos que pueden formar epítomos. En la química combinatoria tradicional, la identificación de la secuencia más favorable para unirse a un receptor específico debe llevarse a cabo mediante la síntesis de cientos de posibles combinaciones de diferentes grupos, tales como aminoácidos, en órdenes diferentes, teniendo que analizarse en cada uno su eficacia. Este procedimiento requiere tiempo, es caro y está limitado por la naturaleza de la química que se puede realizar en la unión de los diferentes componentes juntos.

45 El documento WO 01/01140 proporciona un mejor modo de identificación de epítomos. Se proporciona una composición para interaccionar con un ligando. La composición comprende un ensamblaje no covalente de una pluralidad de conjugados distintos, comprendiendo cada conjugado un grupo de cabeza y un grupo de cola. Los grupos de cola de los conjugados forman una agregación hidrofóbica y los conjugados tienen libertad de movimiento unos respecto de otros dentro del ensamblaje de modo que, en presencia de un ligando, al menos dos de los grupos de cabeza están colocados adecuadamente para formar un epítomo capaz de interaccionar con el ligando más fuertemente que cada uno de los grupos de cabeza individualmente. La pluralidad de los conjugados que tiene la actividad biológica deseada se puede identificar seleccionando un conjunto de conjugados con una disposición de los grupos de cabeza formando una asociación no covalente de ellos, donde los grupos de cola se agregan hidrofóticamente y donde los conjugados exhiben libertad de movimiento unos con respecto de otros y analizando una interacción suficiente entre la asociación no covalente y el ligando. Este procedimiento se puede repetir con una matriz modificada de grupos de cabeza con el fin de producir una interacción suficiente entre la asociación no covalente y el ligando. Este procedimiento permite la identificación de la secuencia más favorable para la unión a un receptor específico dependiendo de la proximidad de los grupos de cabeza para proporcionar epítomos derivados de la asociación sin la necesidad de la síntesis de cientos de posibles combinaciones de grupos diferentes usando química combinatoria tradicional. El procedimiento simplemente depende de la proximidad de los grupos de cabeza para proporcionar epítomos derivados de la asociación. Una vez que se ha sintetizado un conjunto de conjugados no se requiere una química sintética adicional, sólo mezclar simplemente los conjugados para formar las diferentes sondas mediante asociación no covalente.

65

Aunque esta nueva composición y procedimiento han tenido éxito para identificar los grupos funcionales que forman el epítipo y se unen al ligando diana, sigue existiendo un requisito de proporcionar mejores composiciones que sean capaces de formar el epítipo deseado e interactuar con una mejor estabilidad y especificidad con el ligando diana para producir una respuesta biológica.

5 Los intentos para producir un péptido análogo al epítipo construido únicamente de los aminoácidos que comprenden el sitio de unión suelen fallar porque estos péptidos no poseen la misma actividad biológica que el receptor proteico.

10 Cuando el sitio de unión de una proteína está formado por oligopéptidos de diferentes partes no contiguas de una cadena proteica, los intentos para reconstruir el sitio de unión mezclando oligopéptidos aislados en solución libre no tienen como resultado el sitio de unión activo.

15 De acuerdo con esto, la presente invención está dirigida a proporcionar mejores oligopéptidos que son capaces de formar un epítipo deseado, que pueden interactuar con una mejor estabilidad y especificidad con el ligando diana para producir una respuesta biológica.

Sumario de la invención

20 La presente invención proporciona un ensayo de detección selectiva para determinar la interacción entre un oligopéptido cíclico y un ligando diana como se define en la reivindicación 1.

La invención también proporciona un oligopéptido cíclico limitado internamente como se define en la reivindicación 14.

25 En la técnica se conoce que los péptidos cíclicos tienen una conformación que es más restringida que los oligopéptidos lineales. La libertad de movimientos de los extremos del péptido está limitada en un péptido cíclico porque están anclados juntos químicamente. No obstante, los péptidos cíclicos todavía tienen un grado considerable de flexibilidad que los convierte en inadecuados para participar en interacciones de unión estables con un ligando diana.

30 Construyendo oligopéptidos cíclicos con dos o más grupos funcionales en asociación colocados de modo que formen una o más asociaciones intracíclicas, el oligopéptido cíclico está limitado internamente en una conformación única. Esto permite que los aminoácidos que forman un epítipo en cada dominio se unan específicamente a un ligando diana con más estabilidad y especificidad que las disponibles hasta ahora. Los aminoácidos que forman el epítipo son capaces de formar un epítipo estable para interactuar con un ligando para inducir una respuesta biológica. Dado que el epítipo se forma de un modo estable, existe una interacción mejorada con el ligando diana.

35 El documento US 2005/0107289 divulga agentes antimicrobianos y composiciones que incluyen péptidos cíclicos que tienen una secuencia de aminoácidos de D- y L- α -aminoácidos o β -aminoácidos. Se cree que este documento divulga además que los péptidos cíclicos se autoensamblan en estructuras supramoleculares dentro o por asociación con membranas microbianas. Dichas estructuras supramoleculares pueden ser, por ejemplo, nanotubos. Cada nanotubo tiene un poro en el centro del tubo que está rodeado por una serie de estructuras peptídicas de los péptidos cíclicos apilados. Los iones y las moléculas pequeñas pueden viajar a través de los poros de los nanotubos.

40 El documento US 2005/0107289 no divulga que los péptidos cíclicos comprenden aminoácidos formadores de epítopos que forman epítopos capaces de unirse específicamente a un ligando diana. El documento US 2005/0107289 tampoco divulga que los péptidos cíclicos están limitados por asociaciones intracíclicas con el fin de permitir la formación de dichos epítopos.

45 G. Abbenante et al. "Conformational Control by Thiazole and Oxazoline Rings in Cyclic Octapeptides of Marine Origin. Novel Macrocyclic Chair and Boat Conformations; J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 10384 - 10388 divulgan la adaptación de bloques componentes de aminoácidos (Thr, Cys) como limitaciones conformacionales del anillo (oxazolona, tiazol) para regular estructuras tridimensionales y reactividades de macrociclos marinos. El octapéptido cíclico 1 c[Ile-Thr-D-Val-Cys-Ile-Thr-D-Val-Cyc-] es muy flexible y adopta muchas estructuras de baja energía. Este octapéptido cíclico no tiene ninguna asociación intracíclica y no está limitado en una conformación única para formar una pluralidad de epítopos.

50 G. Abbenante et al. "Conformational Control by Thiazole and Oxazoline Rings in Cyclic Octapeptides of Marine Origin. Novel Macrocyclic Chair and Boat Conformations; J. Am. Chem. Soc. 1996, 118, 10384 - 10388 también divulgan el péptido cíclico 2 c[Ile-Thr-D-(Val)Thz-Ile-Thr-D-(Val)Thz-], que mostró una única conformación en silla falsa en solución I. El péptido cíclico 7 c[(Ile)Oxn-D-(Val)-Thz-(Ile)Oxn-D-(Val)Thz-] se sintetizó y produjo un macrociclo con forma de silla de montar o barca falsa altamente limitado. El octapéptido cíclico 8, producido por hidrólisis ácida de 7, mostró una conformación en barca con una flexibilidad mayor. Estos octapéptidos cíclicos están limitados hasta cierto punto por la presencia de las oxazolinonas y/o tiazoles, pero no forman una pluralidad de

epítapos.

5 R. M. Cusack et al., Conformations of cyclic octapeptides and the influence of heterocyclic ring constraints upon calcium binding; J. Chem. Soc, Perkin Trans. 2, 2000, 323 - 331 divulgan cuatro octapéptidos cíclicos que difieren en el número de limitaciones del anillo de tiazol y oxazolinona heterocíclicas. Los péptidos 1, 2 y 3 adoptaron diferentes formas en solución. Estos octapéptidos cíclicos están limitados hasta cierto punto por la presencia de las oxazolinonas y/o tiazoles, pero no forman una pluralidad de epítapos.

10 R. M. Cusack et al, Conformations of cyclic octapeptides and the influence of heterocyclic ring constraints upon calcium binding; J. Chem. Soc, Perkin Trans. 2, 2000, 323 - 331 también divulgan el péptido 4 que carece de los anillos de oxazolinona y tiazol y la modelación molecular mostró que dichos péptidos cíclicos que carecen de limitaciones aparte del enlace de hidrógeno son muy flexibles y potencialmente pueden adoptar una miríada de conformaciones en solución. El péptido 4 no tiene ninguna asociación intracíclica y no está limitado en una conformación única para formar una pluralidad de epítapos.

15 El oligopéptido cíclico de la presente invención se describirá con mayor detalle a continuación.

20 El oligopéptido cíclico comprende un anillo de aminoácidos como se define en la reivindicación 1 o la reivindicación 14, donde el anillo comprende dos dominios de aminoácidos, en los que cada dominio que comprende tres cuatro aminoácidos formadores de al menos dos epítapos y dos grupos funcionales en asociación.

25 En una realización preferida, el oligopéptido cíclico consiste en un anillo de ocho aminoácidos, donde el anillo consiste en dos dominios de aminoácidos, consistiendo cada dominio en tres aminoácidos formadores de epítapo y dos grupos funcionales en asociación.

30 En una realización alternativa, el oligopéptido cíclico comprende un anillo de más de ocho aminoácidos. En esta realización, preferentemente, el anillo comprende tres grupos funcionales en asociación que forman asociaciones intracíclicas para producir tres dominios de aminoácidos, comprendiendo cada dominio tres aminoácidos formadores de epítapo.

Los aminoácidos usados en el oligopéptido cíclico pueden ser cualquiera de los aminoácidos naturales, derivados sustituidos, análogos y formas D de los mismos.

35 En una realización preferida de la presente invención, existen tres aminoácidos formadores de epítapo que tienen configuraciones estereoquímicas alternas, es decir L-D-L o D-L-D. Esto es particularmente ventajoso porque permite que las cadenas laterales de los aminoácidos formadores de epítapo se orienten en una configuración plana, todos enfrentando a la misma dirección. Esto permite que los aminoácidos formadores de epítapo estén muy próximos entre sí para formar el epítapo.

40 En una realización alternativa, el oligopéptido cíclico consiste en un anillo de diez aminoácidos, donde el anillo consiste en dos dominios de aminoácidos, consistiendo cada dominio en cuatro aminoácidos formadores de epítapo y dos grupos funcionales en asociación. Los aminoácidos formadores de epítapo pueden tener las mismas configuraciones estereoquímicas o alternas, es decir L-L-L-L, D-D-D-D, L-D-L-L, L-L-D-D, D-L-L-L, L-L-D-D, D-D-L-L, L-D-L-D, D-L-D-L, D-L-L-D, D-L-D-D, D-D-L-D, D-D-D-L o L-D-D-D.

45 Los grupos funcionales en asociación están colocados en el oligopéptido cíclico de modo que forman una o más asociaciones intracíclicas, de modo que el oligopéptido cíclico esté limitado en una única conformación de forma que los aminoácidos formadores de epítapos forman un epítapo en cada dominio. La formación de una única conformación en un oligopéptido cíclico se puede medir mediante una serie de procedimientos diferentes que son bien conocidos en la técnica. Se pueden usar procedimientos espectroscópicos estándar, tales como espectroscopia RMN de ¹H, dicroísmo circular, dispersión rotatoria óptica o cristalografía de ratos X para determinar la conformación del oligopéptido cíclico.

50 Los aminoácidos formadores de epítapo forman un epítapo en cada dominio porque el oligopéptido cíclico está limitado en una conformación única por una o más asociaciones intracíclicas. Los epítapos formados son capaces de unirse específicamente a un ligando diana. La estructura específica del epítapo y el ligando diana no está limitada en la presente invención. El objetivo de la presente invención es proporcionar un armazón oligopeptídico que presenta una pluralidad de epítapos comprendidos por cualquier combinación adecuada de al menos dos aminoácidos formadores de epítapos, análogos o derivados de los mismos, en un modo tal que estos aminoácidos formadores de epítapos se mantienen en una configuración estable que posee suficiente rigidez para permitir que el epítapo se una fuertemente a un ligando diana específico, tal como un receptor. El experto en la técnica puede conocer la secuencia de los aminoácidos formadores de epítapos o puede usar un procedimiento como el divulgado en el documento in WO 01/01140 para proporcionar un epítapo que interacciona con el ligando diana. El experto en la técnica no necesita estructuras químicas detalladas de todos los posibles epítapos porque puede seleccionar fácilmente aminoácidos adecuados para formar un epítapo. Cualquier secuencia de aminoácidos formadores de epítapos puede ser adecuada en cualquier situación dada y esto dependerá del ligando diana. Además, el orden de

los aminoácidos en cada dominio puede determinar la actividad del epítipo formado y también dependerá del ligando diana. No es necesario conocer la estructura química exacta del ligando siempre que la actividad biológica del ligando diana se conozca. Los aminoácidos formadores de epítipos se pueden incluir en el oligopéptido cíclico de la presente invención sin la necesidad de conocer la estructura química exacta del ligando porque la función biológica asociada con el ligando puede medirse para determinar si se ha producido o no la interacción entre el epítipo y el ligando. El experto en la técnica, en base a los datos experimentales obtenidos en el modelo de ensayo adecuado, puede seleccionar fácilmente aminoácidos para incluir en el oligopéptido cíclico como aminoácidos formadores de epítipos y determinar qué orden de aminoácidos en cada dominio proporciona la mejor actividad biológica analizando la actividad deseada.

Ejemplos de ensayos para determinar la interacción entre el oligopéptido cíclico y el ligando diana puede incluir ensayos de unión como los que usan el principio del ELISA para la detección de asociación entre el anticuerpo y el antígeno. Otros ensayos *in vitro* adecuados incluyen la modificación de la fluorescencia de las sondas fluorescentes unidas a la membrana sensibles al medioambiente, reacciones de precipitación, potenciación o inhibición de la actividad enzimática etc. Los ensayos que dependen de la capacidad de los materiales para alterar el comportamiento de las células cultivadas *in vitro* también pueden ser adecuados, tales como ensayos de muerte celular, proliferación celular, apoptosis, inhibición o estimulación del contacto entre células, secreción de citocinas u otros productos solubles, síntesis de ARNm específico, transporte vesicular intracelular, alteración e los procesos de señalización celular etc. También se pueden efectuar ensayos *in vivo* en animales enteros o seres humanos, por ejemplo incorporación de radiomarcaje en el oligopéptido cíclico, seguida de investigación de su posterior distribución después de la administración por varias vías.

Se forma un epítipo en cada dominio. Por tanto, el número de epítipos formados en el oligopéptido cíclico es dos. Los epítipos en el oligopéptido cíclico pueden ser iguales o diferentes. Cuando los epítipos en el oligopéptido cíclico son diferentes, cada dominio puede tener diferentes aminoácidos o tener los mismos aminoácidos pero en un orden diferente. Un ejemplo de este epítipo es el formado por la combinación de los aminoácidos serina (S), fenilalanina (F) y arginina ®, que se unen a un receptor de superficie celular sobre los macrófagos. La unión del epítipo al receptor de la superficie celular produce la inhibición de la secreción de TNF.

Asociaciones intracíclicas

La una o más asociaciones intracíclicas sirven para limitar el oligopéptido cíclico en una única conformación con una pluralidad de dominios de aminoácidos. Los aminoácidos formadores de epítipos en cada dominio están estrechamente limitados con una libertad de movimiento muy limitada. Esto permite la formación de un epítipo estable en cada dominio que puede interactuar con mejor estabilidad y especificidad con el ligando diana para producir una respuesta biológica.

La una o más asociaciones intracíclicas se forman mediante dos grupos funcionales en asociación colocados adecuadamente. Al menos un grupo funcional en asociación está colocado, preferentemente, entre cada uno de los dominios de aminoácidos.

La una o más asociaciones intracíclicas son no covalentes. Los grupos funcionales en asociación en el oligopéptido cíclico pueden ser iguales o diferentes.

Los grupos funcionales en asociación son portados sobre aminoácidos en asociación. En una realización, los grupos funcionales en asociación son las cadenas laterales de los aminoácidos en asociación o las cadenas laterales modificadas de los aminoácidos en asociación o los grupos añadidos sobre la cadena lateral de los aminoácidos en asociación. Un ejemplo de esta realización se representa en la estructura I a continuación.

También se escriben oligopéptidos cíclicos en los que los grupos funcionales en asociación pueden estar portados sobre los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos en el anillo del oligopéptido cíclico mediante sustitución del hidrógeno unido al nitrógeno. Un ejemplo de este péptido se representa en la estructura II a continuación.

También se describen oligopéptidos cíclicos en los que los grupos funcionales en asociación pueden estar en otros grupos adecuados ubicados dentro del anillo oligopeptídico, que no son aminoácidos. Un ejemplo de un grupo de este tipo es un ácido carboxílico alfa hidroxilado, donde el grupo hidroxilado participa en un enlace éster, en lugar de un enlace peptídico;

La expresión "dos grupos funcionales en asociación" hace referencia a la realización siguiente

- donde la asociación intracíclica es no covalente:
 - o los grupos funcionales en asociación son dos grupos colgantes del anillo oligopeptídico portado en los aminoácidos en asociación dentro del anillo, que se asocian para formar la asociación no covalente;

También se describen péptidos en los que

- los grupos funcionales en asociación son dos grupos colgantes del anillo oligopeptídico portado en los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos dentro del anillo, que se asocian para formar la asociación no covalente;
 - o los grupos funcionales en asociación son dos grupos colgantes del anillo oligopeptídico portado en otros grupos adecuados ubicados en el anillo, que se asocian para formar la asociación no covalente; o
- 5
- donde la asociación intracíclica es covalente:
 - los grupos funcionales en asociación son dos grupos portados en los aminoácidos en asociación dentro del anillo, que están unidos para formar la asociación covalente bien directamente o mediante un ligador, tal como un grupo bifuncional;
 - los grupos funcionales en asociación son dos grupos portados sobre los átomos de nitrógeno de enlaces peptídicos dentro del anillo, que están unidos para formar la asociación covalente bien directamente o mediante un ligador, tal como un grupo bifuncional; o
 - los grupos funcionales en asociación son dos grupos portados sobre otros grupos adecuados en el anillo, que están unidos para formar la asociación covalente bien directamente o mediante un ligador, tal como un grupo bifuncional.
- 10
- 15

La expresión “portado sobre” significa que los grupos en asociación están unidos directamente o unidos a través de un ligador adecuado a los aminoácidos en asociación, átomos de nitrógeno u otros grupos adecuados.

20

La una o más asociaciones intracíclicas entre los grupos funcionales en asociación son no covalentes. Las asociaciones intracíclicas no covalentes son particularmente preferidas en la presente invención porque permiten que el oligopéptido cíclico tenga el equilibrio correcto entre rigidez y flexibilidad. El oligopéptido cíclico es lo bastante rígido para mantener la estructura peptídica en una conformación y garantizar que los aminoácidos formadores de epítipo estén ubicados lo bastante cercanos entre sí y correctamente para formar un epítipo capaz de unirse específicamente a un ligando diana. El oligopéptido cíclico es también lo bastante flexible para permitir un movimiento suficiente de las cadenas laterales de los aminoácidos formadores de epítipos para adaptar la estructura precisa del ligando diana al que se pueden unir. Por tanto, los oligopéptidos cíclicos de la presente invención que comprenden asociaciones intracíclicas no covalentes pueden interaccionar con mejor estabilidad y especificidad con un ligando diana para producir una respuesta biológica.

25

30

Las asociaciones intracíclicas son hidrofóbicas. Existen dos dominios de aminoácidos y dos grupos funcionales en asociación lipófilos.

35

Los grupos funcionales en asociación son portados sobre aminoácidos en asociación o análogos de los mismos, ejemplos de los cuales se citan a continuación, aunque pueden usarse otros grupos capaces de insertarse en el anillo oligopeptídico cíclico. Generalmente se prefiere que los grupos sobre los cuales se encuentran grupos funcionales en asociación están unidos en el anillo mediante enlaces peptídicos. En una realización alternativa, uno o más de los enlaces peptídicos se pueden sustituir por otros tipos de unión. Ejemplos de estos enlaces son enlaces éster, enlaces éter, enlaces tioéster y enlaces tioéter. Esto puede ser deseable una vez con el fin de limitar el ataque por las proteasas en fluidos biológicos.

40

Los aminoácidos en asociación pueden comprender aminoácidos naturales que portan los grupos funcionales en asociación.

45

Preferentemente, los aminoácidos en asociación son análogos de aminoácidos lipídicos. Por ejemplo, los aminoácidos en asociación pueden comprender entre cisteína, glicina, lisina, ácido aspártico o ácido glutámico. En el caso de la cisteína, el grupo funcional en asociación puede ser un grupo alifático añadido sobre la cadena lateral de la cisteína mediante la funcionalidad sulfhidrilo. La lisina, ácido aspártico y ácido glutámico también se puede usar de este modo añadiendo el grupo funcional en asociación sobre la cadena lateral. El aminoácido en asociación puede ser, como alternativa, un aminoácido donde el residuo de la cadena lateral es un único grupo alifático que constituye el grupo funcional en asociación. Por ejemplo, si un aminoácido en asociación está basado en glicina, el hidrógeno alfa de la glicina se puede sustituir por un grupo alifático que constituye el grupo funcional en asociación.

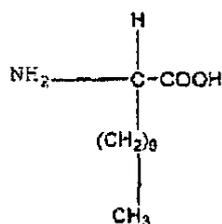
50

55

El grupo alifático al que se hace referencia anteriormente es un hidrocarburo alifático que tiene de 8 a 20 átomos de carbono y, más preferentemente, comprende de 10 a 16 átomos de carbono, lo más preferentemente de 10 a 12 carbonos y puede estar saturado o insaturado, de cadena lineal o ramificado e insustituido o sustituido totalmente o en parte, por ejemplo con átomos de halógeno. Como alternativa, el grupo alifático puede estar compuesto por restos de silano.

60

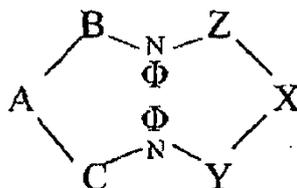
En la estructura I de ejemplo siguiente, el aminoácido en asociación es glicina, donde el hidrógeno alfa se ha sustituido por una cadena de hidrocarburo de C₁₀.



5 También se describen péptidos en los que los grupos funcionales en asociación están portados sobre los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos en el anillo, pueden producirse asociaciones intracíclicas no covalentes, tales como asociaciones hidrofóbicas sustituyendo los átomos de hidrógeno sobre los nitrógenos de los enlaces peptídicos mediante los grupos funcionales en asociación tales como, por ejemplo, el grupo alifático, como se ha definido anteriormente.

10 La sustitución de un átomo de hidrógeno sobre un nitrógeno de un enlace peptídico en el oligopéptido cíclico mediante un grupo funcional en asociación se puede realizar sustituyendo primero el átomo de hidrógeno con un grupo metileno portador de un grupo funcional adecuado tal como, por ejemplo, -SH,-OH o -NH₂, seguido después por derivatización con el grupo funcional en asociación, tal como un grupo alifático como se ha definido anteriormente.

15 Cuando el nitrógeno procede de un enlace peptídico que une dos aminoácidos formadores de epítopos de dominios de aminoácidos separados, el oligopéptido cíclico de la presente invención puede tener la siguiente estructura II:



20 donde A, B, C, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipo, N representa el nitrógeno de los enlaces peptídicos entre B/Z y C/Y y Φ representa los grupos funcionales en asociación, tales como un grupo alifático como se ha definido anteriormente, unidos a nitrógeno.

25 Una ventaja adicional del uso de grupos funcionales en asociación no covalentes y particularmente hidrófobos es que esto puede permitir interacciones intermoleculares, donde los grupos funcionales en asociación hidrófobos de diferentes oligopéptidos cíclicos se asocian entre sí para producir dímeros u oligómeros que contienen una multiplicidad de epítopos repetidos orientados en diferentes direcciones. La extensión a la cual dichas interacciones tienen lugar depende de la estructura de la secuencia del oligopéptido cíclico, que determina la hidrofiliidad relativa de los dominios de aminoácidos. Esto se puede controlar además mediante la elección juiciosa del grupo funcional en asociación, donde la quiralidad y el volumen se pueden modificar para controlar la cantidad precisa de superficie hidrofóbica del oligopéptido expuesto. Esto puede ser ventajoso en la modulación de interacciones intermoleculares con otros oligopéptidos limitados internamente o interacciones con otras moléculas tales como proteínas o ciclodextrinas. Esto puede suponer una ventaja en la creación de pequeñas estructuras multiméricas que comprenden dos o más oligopéptidos cíclicos de la presente invención, que se pueden unir a dos o más receptores de la superficie celular al mismo tiempo, de modo que se reticulan los receptores de una forma tal que se presenta a la célula un fuerte desencadenante de la iniciación, lo que tiene como resultado una cascada de la señal.

40 Las interacciones de los oligopéptidos cíclicos de la presente invención con otros oligopéptidos cíclicos no idénticos de la presente invención pueden ser ventajosos en la creación de estructuras multiméricas que poseen una funcionalidad múltiple en virtud de diferentes epítopos que contribuyen a la estructura mediante los diferentes oligopéptidos. Por tanto, por ejemplo, un oligopéptido puede comprender uno o más epítopos que se unen a los receptores que permiten internalizar la estructura multimérica, mientras que un segundo oligopéptido dentro de la estructura multimérica puede comprender uno o más epítopos que pueden interactuar con componentes de una cascada de señalización dentro de la célula, después de la internalización.

45 La unión de las ciclodextrinas a los oligopéptidos cíclicos de la presente invención puede ayudar a reducir el nivel de interacciones entre las partes hidrofóbicas de diferentes oligopéptidos y, por tanto, prevenir la formación de agregados grandes cuya actividad se puede reducir en comparación con los monómeros u oligómeros por la hidrancia estérica de los epítopos en estos agregados grandes.

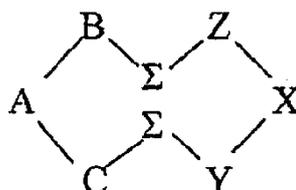
50 En las soluciones de proteínas, tales como albúmina o gelatina, uno o más de los oligopéptidos cíclicos de la invención se pueden unir a la superficie de la proteína como resultado de la asociación de los restos lipófilos de los grupos funcionales en asociación hidrofóbicos en el péptido con regiones de la proteína que poseen una afinidad por

las cadenas de hidrocarburo de alquilo o acilo. Dicha unión de uno o más oligopéptidos cíclicos de la presente invención sobre la superficie de una proteína grande es un modo de disponer que se presenta una matriz múltiple de epítomos sobre los oligopéptidos cíclicos de un modo tal que se maximiza el desencadenante de interacciones de señalización en las células.

5 También se describen oligopéptidos que son las una o más asociaciones intracíclicas entre los grupos funcionales en asociación son covalentes. En este péptido, los grupos funcionales en asociación también pueden estar portados sobre aminoácidos en asociación. Por ejemplo, los grupos funcionales en asociación también pueden ser las cadenas laterales de cisteínas (aminoácidos en asociación) y la asociación se forma mediante un enlace disulfuro intracíclico entre estas cadenas laterales. Como alternativa, los aminoácidos en asociación pueden ser lisina y ácido glutámico, que se pueden asociar covalentemente mediante la formación de un enlace peptídico a través de los grupos terminales en sus cadenas laterales (grupos funcionales en asociación) o ácido glutámico y serina, que pueden reaccionar para formar un enlace éster. También se pueden usar análogos de estos aminoácidos portadores de los mismos restos funcionales.

15 En un oligopéptido descrito se puede conseguir una asociación intracíclica covalente sustituyendo los hidrógenos unidos a los átomos de nitrógeno de enlaces peptídicos en el anillo con los grupos funcionales en asociación, que forman asociaciones covalentes. Los grupos funcionales en asociación pueden ser tioles u otras cadenas portadoras de grupos funcionales en sus extremos, que pueden formar una asociación covalente. La sustitución de un átomo de hidrógeno sobre un nitrógeno de un enlace peptídico en el oligopéptido cíclico de la presente invención mediante un grupo funcional en asociación se puede realizar sustituyendo primero el átomo de hidrógeno con un grupo metileno portador de un grupo funcional adecuado tal como, por ejemplo, -SH, -OH o -NH₂, seguido después por una segunda etapa de unión del grupo funcional a un reactivo bifuncional. La asociación covalente se forma mediante sustitución adicional de un segundo átomo de hidrógeno (sobre un nitrógeno de un enlace peptídico situado en una posición adecuada dentro del oligopéptido cíclico) con un segundo grupo de metileno portador de un grupo funcional adecuado y el reactivo bifuncional anterior se une adicionalmente al grupo funcional de este segundo grupo de metileno para crear un enlace covalente entre dos átomos de nitrógeno de enlaces peptídicos en el oligopéptido cíclico. Dependiendo de la naturaleza de los grupos funcionales en asociación incorporados en los oligopéptidos cíclicos, los reactivos bifuncionales adecuados serían aquellos que comprenden una cadena corta donde cada uno de los extremos poseen un grupo funcional seleccionado de, entre otros, la lista siguiente: grupos carboxilo, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, bromo, yodo, ciano, azo y ácido borónico.

35 En un aspecto concreto de la presente invención donde el oligopéptido cíclico comprende dos dominios de aminoácidos y dos grupos funcionales en asociación, cada uno portado sobre un aminoácido en asociación, y se forma un epítomo con los tres aminoácidos formadores de epítomos en cada dominio, el oligopéptido cíclico puede tener la siguiente estructura:



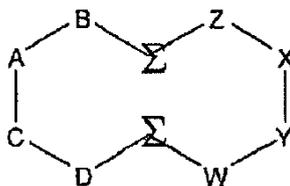
40 donde A, B, C, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítomos; A y X representan aminoácidos D y B, C, Y y Z representan aminoácidos L o A y X representan aminoácidos L y B, C, Y y Z representan aminoácidos D; se forma un epítomo con el dominio A-B y se forma un epítomo con el dominio Z-X-Y; y cada Σ representa un aminoácido en asociación portador de un grupo funcional en asociación.

45 En un ejemplo de un oligopéptido cíclico de acuerdo con la presente invención, el dominio Z-X-Y y/o C-A-B pueden seleccionarse de las secuencias de aminoácidos RFS, RSF, FSR, FRS, SRF, SFR, QLS, QSL, SQL, SLQ, LQS o LSQ y cada Σ es un aminoácido lipídico con una cadena lateral de hidrocarburo lineal de C₁₀ como el grupo funcional en asociación. Preferentemente, el dominio Z-X-Y es RFS, donde se prefiere que la fenilalanina tiene una configuración D, la serina tiene una configuración L, arginina tiene una configuración L y cada aminoácido lipídico tiene una configuración L. En una realización preferida, el dominio Z-X-Y y/o el dominio C-A-B seleccionado de las secuencias anteriores forman cada uno un epítomo capaz de suprimir la secreción de TNF. De acuerdo con esto, estas secuencias pueden ser útiles en el tratamiento de una enfermedad donde el TNF es un factor agravante, por ejemplo, una enfermedad se selecciona de cáncer, obesidad, trastornos cardíacos, enfermedad autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias. Estas secuencias se pueden usar para tratar una enfermedad autoinmunitaria seleccionada de artritis reumatoide, esclerosis múltiple y enfermedad de Crohn.

En la estructura anterior, el dominio C-A-B puede ser igual o diferente del dominio Z-X-Y.

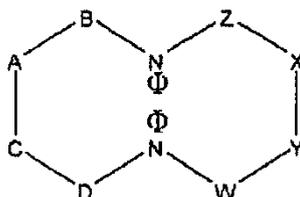
60 En un aspecto adicional de la presente invención, el oligopéptido cíclico comprende dos dominios y se forma un epítomo con cuatro aminoácidos formadores de epítomo en cada dominio. En una realización de este aspecto de la

invención, el oligopéptido cíclico tiene la estructura siguiente:



5 donde , B, C, D, W, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipo; se forma un epítipo con el dominio D-C-A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y-W; y cada Σ representa un aminoácido en asociación.

En una alternativa, un oligopéptido cíclico tiene la estructura siguiente:



10 donde , B, C, D, W, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipo; se forma un epítipo con el dominio D-C-A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y-W; cada N representa el nitrógeno de los enlaces peptídicos entre B-Z and C-Y y cada Φ representa un grupo funcional en asociación unido a través del nitrógeno.

15 En un ejemplo de este oligopéptido cíclico, el dominio Z-X-Y-W y/o el dominio D-C-A-B pueden seleccionarse de las secuencias de aminoácidos YEKA, YEAK, YAKE, YAEK, YKAE, YKEA, EYKA, EYAK, EKAY, EKYA, EAKY, EAYK, KAYE, KAEY, KYAE, KYEA, KEAY, KEYA, AKEY, AKYE, AYEK, AYKE, AEYK o AEKY y cada Σ es un aminoácido lipídico con un grupo funcional en asociación en la cadena lateral de hidrocarburo lineal que comprende una cadena de hidrocarburo de una longitud de entre 8 y 20 carbonos. Preferentemente, el dominio Z-X-Y-W es YEKA y el dominio D-C-A-B es EYAK. En una realización preferida, el dominio Z-X-Y-W y/o el dominio D-C-A-B seleccionado de las secuencias anteriores forman cada uno un epítipo capaz de inhibir la actividad proteolítica. De acuerdo con esto, estas secuencias se pueden usar para tratar una enfermedad donde la actividad de la proteasa es un factor agravante, tal como enfermedad cardiovascular, trastornos de la circulación y VIH.

25 El dominio D-C-A-B puede ser igual que el dominio Z-X-Y-W.

Composiciones

30 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende el oligopéptido cíclico como se ha definido anteriormente y un excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable. El excipiente se selecciona, preferentemente, de transcutil, copolímeros de bloque con poloxámero, ciclodextrinas, tensoactivos no iónicos y sales biliares. Si el excipiente es un tensoactivo no iónico se selecciona, preferentemente, de ésteres de acilo de polietilenglicol o éteres alifáticos de polietilenglicol.

35 Como se ha tratado anteriormente, en una realización de la invención se pueden formar asociaciones intercíclicas entre oligopéptidos cíclicos separados en los que los grupos funcionales en asociación hidrofóbicos de diferentes oligopéptidos cíclicos se asocian entre sí para producir dímeros u oligómeros que contienen una multiplicidad de epítopos repetidos orientados en diferentes reacciones. La extensión de las interacciones intercíclicas se puede modificar mezclando de forma conjunta excipientes que ayudan a la solubilización de restos hidrofóbicos en medios acuosos.

Usos

45 En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un oligopéptido cíclico como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente, para uso como medicamento, profiláctico o diagnóstico.

50 También se describe el uso de un oligopéptido cíclico como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad donde el TNF es un factor agravante. Preferentemente, la enfermedad se selecciona de obesidad, trastornos cardíacos, enfermedad autoinmunitaria y enfermedades inflamatorias. Más preferentemente, la enfermedad es artritis reumatoide o enfermedad de Crohn. El oligopéptido cíclico como se ha definido anteriormente se puede usar para tratar el cáncer donde el TNF es un factor agravante. El cáncer puede ser benigno o maligno. El cáncer es, preferentemente, un

tumor sólido. Dichos cánceres incluyen, entre otros, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cánceres de piel y cánceres epiteliales.

5 También se describe el uso de un oligopéptido cíclico como se ha definido anteriormente o una composición como se ha definido anteriormente para la fabricación de un medicamento para tratar una enfermedad donde la actividad proteasa es un factor agravante, incluyendo enfermedad cardiovascular, trastornos de la circulación y VIH. Cada dominio en el oligopéptido cíclico puede comprender aminoácidos formadores de epítipo, SRER, SERE, EYKA, YEAK, SFR o RFS, que se muestra en el ejemplo 7 para inhibir la actividad proteolítica de la trombina.

10 En una realización específica de la presente invención descrita en lo que antecede, el oligopéptido cíclico comprende los aminoácidos serina, fenilalanina y arginina como los aminoácidos formadores de epítipo en al menos uno de los dominios. Se ha demostrado que estos oligopéptidos muestran actividad en inhibición de la secreción de TNF en los macrófagos. En un aspecto preferido de esta realización, los grupos funcionales en asociación son aminoácidos lipídicos con cadenas laterales de hidrocarburo de C₁₂ y los aminoácidos formadores de epítipo se seleccionan de RFS, FSR o SRF, donde el aminoácido central está en forma D y los dos aminoácidos externos están en forma L. Cada epítipo en el oligopéptido cíclico puede ser igual o diferente.

20 En virtud de su capacidad para regular por disminución la secreción de TNF, estos oligopéptidos pueden tener eficacia en el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, obesidad, trastornos cardíacos, enfermedad autoinmunitaria y otras enfermedades en las que está implicado un proceso inflamatorio. En virtud de su capacidad para regular por disminución la secreción de TNF, estos oligopéptidos pueden también tener eficacia en el tratamiento del cáncer, donde el TNF es un factor agravante. El cáncer puede ser benigno o maligno. El cáncer es, preferentemente, un tumor sólido. Dichos cánceres incluyen, entre otros, cáncer de ovarios, cáncer de mama, cánceres de piel y cánceres epiteliales.

25 En una realización específica de la presente invención descrita en lo que antecede, el oligopéptido cíclico comprende los aminoácidos A, K, E e Y como los aminoácidos formadores de epítipo en al menos uno de los dominios. Se ha demostrado que estos oligopéptidos muestran actividad en inhibición de la secreción de TNF en los macrófagos. En un aspecto preferido de esta realización, los grupos funcionales en asociación son aminoácidos lipídicos con cadenas laterales de hidrocarburo de C₁₀ y los aminoácidos formadores de epítipo se seleccionan de YEKA y EYAK. Cada epítipo en el oligopéptido cíclico puede ser igual o diferente. La eficacia de Copaxone (acetato de glatiramer), un copolímero aleatorio que comprende los aminoácidos A, K, E e Y, en el tratamiento de la esclerosis múltiple, se considera que se refleja por la capacidad de este compuesto para regular por disminución la secreción de TNF *in vivo*. (Ref: Weber MS, Starck M, Wagenpfeil S, Meinel E, Hohlfeld R & Farina C. Multiple sclerosis: glatiramer acetate inhibits monocyte reactivity *in vitro* and *in vivo*. Brain 127 ppl370 - 8 (2004)). A este respecto, el oligopéptido cíclico ciclo (-A-K-Σ-Y-E-K-A-Σ-E-Y) analizado en el ejemplo 6 también será útil en el tratamiento de la esclerosis múltiple, ya que comprende los mismos aminoácidos en una configuración no aleatoria y muestra el mismo efecto sobre la secreción de TNF por los macrófagos. Otras disposiciones en las secuencias de A, K, E y Y en los oligopéptidos cíclicos de acuerdo con la presente invención también se pueden usar para tratar la esclerosis múltiple.

40 Una ventaja de la invención es que se puede conseguir fuertes interacciones de unión específicas con el oligopéptido cíclico de la presente invención en comparación con receptores biológicos convencionales. El oligopéptido cíclico puede ser relativamente pequeña, que comprende, preferentemente, no más de 8 aminoácidos. De acuerdo con esto, el oligopéptido cíclico de acuerdo con la presente invención se puede hacer mucho menos inmunogénico que sus homólogos proteicos.

45 De acuerdo con este aspecto de la invención, el oligopéptido cíclico de la presente invención no solo puede formularse para interactuar con un ligando *in vitro* sino que también se puede usar la composición *in vivo*.

50 El oligopéptido cíclico o la composición de acuerdo con la presente invención se puede administrar por cualquier vía adecuada para la enfermedad en cuestión, incluyendo, entre otras, las vías de administración oral, nasal, rectal, bucal, pulmonar, vaginal, tópica, ocular, ótica, subcutánea, intradérmica, intraarticular, intratecal, intramuscular, intracerebral, intracraneal e intravenosa.

55 Los oligopéptidos cíclicos se pueden administrar en solución acuosa libre o junto con excipientes farmacéuticos en la composición de la presente invención. El oligopéptido cíclico o la composición también se pueden mezclar junto con otros principios moleculares activos para actuar en sinergia con, o, por otro lado, potenciar su actividad como agentes terapéuticos medicinales. Cuando se administran por determinadas vías, por ejemplo oral o rectal, los oligopéptidos o la composición se pueden formular como sólidos, semisólidos o líquidos y cargar en cápsulas, o como sólidos que se han conformado en comprimidos o extruido en pastillas. En este caso, las cápsulas, comprimidos o pastillas pueden tener un recubrimiento entérico, si la vía de administración final va a ser oral. Para aplicación tópica, la formulación como gel, pasta o aceite, es particularmente adecuada, mientras que para la administración pulmonar u oral los oligopéptidos pueden estar en forma de aerosol.

65

Procedimiento

También se describe un procedimiento para producir un oligopéptido cíclico como se define en lo que antecede, que comprende:

5

- i) seleccionar los aminoácidos formadores de epítipo;
- ii) producir un oligopéptido cíclico que incorpore los aminoácidos formadores de epítipo.

10

Se conocen procedimientos para identificar los epítipos. En la química combinatoria tradicional, la identificación de la secuencia más favorable para unirse a un receptor específico debe llevarse a cabo mediante la síntesis de cientos de posibles combinaciones de diferentes grupos, tales como aminoácidos, en órdenes diferentes, teniendo que analizarse en cada uno su eficacia. Este procedimiento requiere tiempo, es caro y está limitado por la naturaleza de la química que se puede realizar en la unión de los diferentes componentes juntos.

15

Como se ha tratado en lo que antecede, los aminoácidos formadores de epítipo se pueden seleccionar mediante varios procedimientos diferentes conocidos por el experto en la técnica.

20

25

30

35

El documento WO 01/01140 proporciona un procedimiento para determinar moléculas que forman un epítipo capaz de interactuar con un ligando deseado que usa un ensamblaje no covalente de una pluralidad de conjugados distintos. Como se describe en las páginas 2 a 5 del documento WO 01/01140, cada conjugado comprende un grupo de cabeza y un grupo de cola, donde los grupos de cola de los conjugados forman una agregación hidrofóbica y los conjugados tienen libertad de movimiento unos respecto de otros dentro del ensamblaje de modo que, en presencia de un ligando, al menos dos de los grupos de cabeza (que son iguales o diferentes) están ubicados adecuadamente para formar un epítipo capaz de interactuar con el ligando más fuertemente que cada uno de los grupos de cabeza individualmente. Los grupos de cabeza son, típicamente, hidrófilos y los grupos de cola son, típicamente, hidrófobos, por ejemplo lipófilos, compuestos por cadenas de hidrocarburo, halófilos, construidos por cadenas de fluorocarbono, o a base de silano. Construyendo conjugados con un grupo de cabeza y un grupo de cola, los grupos de cola se pueden asociar para formar una agregación hidrofóbica que típicamente es un ensamblaje supramolecular, tal como una micela, una estructura lamelar, un liposoma u otra estructura lipídica, en las que el conjugado están orientados de modo que los grupos de cabeza se acercan mucho cuando están en una fase acuosa. Dado que los conjugados son móviles dentro del ensamblaje, los grupos de cabeza son capaces de adoptar una serie de posiciones diferentes dentro del ensamblaje. Los grupos de cabeza, que típicamente no son idénticos, son, por tanto, libres de moverse dentro del ensamblaje y, sorprendentemente, de interactuar cooperativamente para inducir consecuencias biológicas que los grupos de cabeza por sí solos no son capaces de provocar.

40

En un procedimiento descrito adicionalmente, el procedimiento divulgado en el documento WO 01/01140 se usa para seleccionar los aminoácidos formadores de epítipo, donde este procedimiento comprende:

45

- (a) seleccionar un conjunto de conjugados, comprendiendo cada conjugado un grupo de cabeza y un grupo de cola, con una matriz de grupos de cabeza, donde cada grupo de cabeza comprende un aminoácido;
- (b) formar una asociación no covalente del mismo, en que los grupos de cola se agregan hidrofóbicamente y en que los conjugados son móviles;
- (c) analizar una interacción suficiente entre la asociación no covalente y el ligando diana;
- (d) opcionalmente repetir las etapas (a) a (c) usando un conjunto de conjugados con una matriz modificada de grupos de cabeza; y
- (e) al hallar suficiente interacción en la etapa (c) seleccionar los aminoácidos de los grupos de cabeza del conjunto de conjugados como los aminoácidos formadores de epítipo en la etapa (a).

55

60

Ejemplos de ensayos para determinar una "interacción suficiente" pueden incluir ensayos de unión como los que usan el principio del ELISA para la detección de asociación entre el anticuerpo y el antígeno. Otros ensayos *in vitro* adecuados incluyen la modificación de la fluorescencia de las sondas fluorescentes unidas a la membrana sensibles al medioambiente, reacciones de precipitación, potenciación o inhibición de la actividad enzimática etc. Los ensayos que dependen de la capacidad de los materiales para alterar el comportamiento de las células cultivadas *in vitro* también pueden ser adecuados, tales como ensayos de muerte celular, proliferación celular, apoptosis, inhibición o estimulación del contacto entre células, secreción de citocinas u otros productos solubles, síntesis de ARNm específico, transporte vesicular intracelular, alteración e los procesos de señalización celular etc. También se pueden efectuar ensayos *in vivo* en animales enteros o seres humanos, por ejemplo incorporación de radiomarcaje en los ensamblajes supramoleculares, seguida de investigación de su posterior distribución después de la administración por varias vías.

65

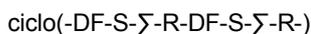
De acuerdo con este procedimiento se usa un abordaje combinatorio donde se prepara una serie de ensamblajes supramoleculares (o "sondas") diferentes, conteniendo cada una de ellas una combinación diferente de conjugados

seleccionados de un banco de presintetizados. La selección de los conjugados adecuados se puede basar en propiedades conocidas del ligando diana o simplemente puede implicar el uso de una gama muy amplia de grupos de cabeza para aumentar la probabilidad de que dos o más de los grupos de cabeza formarán un epítipo para el ligando. De este modo, siguiendo el ensayo para una interacción eficiente entre la sonda y el ligando como se ha descrito anteriormente, la combinación de los conjugados hallada más eficaz se puede modificar añadiendo otros grupos de cabeza, eliminando algunos grupos de cabeza o ambos, y analizando las sondas resultantes de nuevo para una interacción suficiente. En última instancia, la combinación más favorable de grupos de cabeza se puede identificar y seleccionar para usar como aminoácidos formadores de epítipo.

10 Ejemplos

Ejemplo 1. Respuesta a la dosis de oligopéptido cíclico en la supresión de la secreción de TNF estimulada por lipopolisacárido (LPS) en una línea celular de macrófagos

15 1. Se sintetizó un octapéptido cíclico dentro de la estructura:



20 usando procedimientos estándar basados en la técnica a base de resina Merrifield, seguido de ciclación en fase de solución. El péptido purificado se preparó como una solución en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml.

R, F y S representan los aminoácidos formadores de epítopos y Σ representa el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación, donde el aminoácido en asociación es un ácido L-alfa-aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación es un residuo de la cadena lateral que consiste en una

25 cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono.
Todos los aminoácidos están en forma L a menos que se indique lo contrario.
Todos los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos.

30 2. Las células J774A.1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 5×10^5 células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂/aire.

35 3. Al día siguiente, la solución de la etapa 1 se administró a quince pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 50, 25, 12,5, 6,25 o 3,125 µg/ml. El resto de los pocillos se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

40 4. A los pocillos con la solución de octapéptido se añadió lipopolisacárido (de la cepa 0111 B4 de *E. coli*), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración final del lipopolisacárido fue de 0,625 µg/ml.

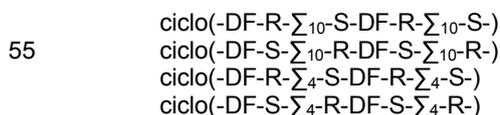
45 5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que la actividad del oligopéptido cíclico en la supresión de la secreción de TNF estimulada por LPS está relacionada con la dosis.

Concentración de péptido (µg/ml)	Concentración de TNF (pg/ml)	Desviación típica
0	1780,09	136,49
3,125	1494,53	127,83
6,25	1346,20	45,84
12,5	1037,31	90,01
25,0	621,75	14,53
50,0	613,70	15,46

Ejemplo 2. Efecto de los oligopéptidos cíclicos con varios grupos funcionales en asociación en la supresión de la secreción de TNF estimulada por el fragmento B de la toxina del cólera (CTB) en una línea celular de macrófagos

50 1. Se prepararon oligopéptidos cíclicos con las estructuras siguientes:



donde S, F y R representan los aminoácidos formadores de epítomos, E representa el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación, donde \sum_{10} representa un aminoácido en asociación racémico que es un ácido aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación es un residuo de la cadena lateral que consiste en $C_{10}H_{21}$ sin ramificar y \sum_4 indica norleucina, donde el grupo funcional en asociación es la cadena lateral de cuatro carbonos.

Estos oligopéptidos cíclicos se prepararon como soluciones en transcutool a una concentración de 5 mg/ml, después se diluyeron a una concentración de 1 mg/ml mediante la adición de agua destilada.

2. Las células J774A.1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 3×10^5 células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO_2 /aire.

3. Al día siguiente, las soluciones de la etapa 1 se administraron a doce pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 12,5 µg/ml. El resto de los pocillos se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

4. A los pocillos con las soluciones de octapéptido se añadió el fragmento B de la toxina del cólera (CTB), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración del fragmento B de la toxina del cólera fue de 10 µg/ml.

5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que la presencia de cadenas laterales de hidrocarburo de cadena larga consistente en un $-C_{10}H_{21}$ sin ramificar, dado que el grupo funcional en asociación da lugar a la actividad de los oligopéptidos cíclicos en la supresión de la secreción de TNF estimulada por el fragmento B de la toxina del cólera. Los oligopéptidos cíclicos en los que el grupo funcional en asociación tiene una longitud de cadena de solo cuatro carbonos no poseen ninguna actividad inhibidora.

Péptido	Concentración de TNF (pg/ml)	Desviación típica
Medio control	67,5	6,7
ciclo(-DF-R- \sum_{10} -S-DF-R- \sum_{10} -S-) + CTB	268,5	17,9
ciclo(-DF-S- \sum_{10} -R-DF-S- \sum_{10} -R-) + CTB	85,7	13,6
ciclo(-DF-R- \sum_4 -S-DF-R- \sum_4 -S-) + CTB	664,7	57,1
ciclo(-DF-S- \sum_4 -R-DF-S- \sum_4 -R-) + CTB	621,1	25,3
CTB solo	690,8	58,6

Ejemplo 3. Efecto de los oligopéptidos cíclicos con varios aminoácidos formadores de epítomo y configuraciones estereoquímicas de los aminoácidos en asociación en la supresión de la secreción de TNF estimulada por lipopolisacárido (LPS) en una línea celular de macrófagos

1. Se prepararon octapéptidos cíclicos con las estructuras siguientes:

- ciclo(-DF-S- \sum_L -R-DF-S-4-R-)
- ciclo(-DF-S- \sum_L -R-DF-S- \sum_D -R-)
- ciclo(-DF-S- \sum_D -R-DF-S- \sum_D -R-)
- ciclo(-DF-R- \sum_L -S-DF-R- \sum_L -S-)
- ciclo(-DF-R- \sum_L -S-DF-R- \sum_D -S-)
- ciclo(-DF-R- \sum_D -S-DF-R- \sum_D -S-)

donde F, S y R son los aminoácidos formadores de epítomos, \sum_L representa un aminoácido en asociación que es un ácido L-alfa aminocarboxílico en que el grupo funcional en asociación es un residuo de cadena lateral que consiste en un $C_{10}H_{21}$ sin ramificar, \sum_D representa un aminoácido en asociación que es un ácido D-alfa aminocarboxílico donde el grupo funcional en asociación es un residuo de cadena lateral que consiste en un $-C_{10}H_{21}$ sin ramificar. Estos oligopéptidos cíclicos se prepararon como soluciones en agua destilada a una concentración de 1 mg/ml.

2. Las células J774A-1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 3×10^5 células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO_2 /aire.

3. Al día siguiente, las soluciones de la etapa 1 se administraron a dieciocho pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 50 µg/ml. El resto de los pocillos se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

4. A los pocillos con las soluciones de octapéptido se añadió lipopolisacárido (de la cepa 0111 B4 de *E. coli*), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración final del lipopolisacárido fue de 1,25 µg/ml.

5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que los oligopéptidos cíclicos que contienen aminoácidos en el orden R-DF-S tienen una actividad elevada en la supresión de la secreción de TNF estimulada por LPS y que se requiere la presencia de al menos un aminoácido en asociación que es ácido L-alfa-aminocarboxílico con un grupo funcional en asociación que es un residuo de cadena lateral que consiste en un -C₁₀H₂₁ sin ramificar, siendo el otro aminoácido en asociación el mismo aminoácido carboxílico en forma L o D.

Péptido	Concentración de TNF (pg/ml)	Desviación típica
LPS solo	1861,9	108,7
ciclo(-DF-S-ΣL-R-DF-S-ΣL-R-) + LPS	865,4	68,1
ciclo(-DF-S-ΣL-R-DF-S-ΣD-R-) + LPS	987,1	16,1
ciclo(-DF-S-ΣD-R-DF-S-ΣD-R-) + LPS	1438,0	32,6
ciclo(-DF-R-ΣL-S-DF-R-ΣL-S-) + LPS	1990,4	N/A
ciclo(-DF-R-ΣL-S-DF-R-ΣD-S-) + LPS	1625,3	59,6
ciclo(-DF-R-ΣD-S-DF-R-ΣD-S-) + LPS	1573,3	45,0

15 La unión de las ciclodextrinas a los oligopéptidos cíclicos de la presente invención ayuda a reducir el nivel de interacciones entre las partes hidrofóbicas de diferentes oligopéptidos y, por tanto, prevenir la formación de agregados grandes cuya actividad se puede reducir en comparación con los monómeros u oligómeros por la hidrancia estérica de los epítomos en estos agregados grandes.

20 **Ejemplo 4. Efecto relacionado con la dosis de un oligopéptido cíclico limitado internamente formulado con hidroxipropil beta-ciclodextrina y que contiene epítomos formados por los aminoácidos formadores de epítomo R-DF-S, en la supresión de la secreción de TNF estimulada por lipopolisacárido (LPS) en una línea celular de macrófagos en una amplia gama de concentraciones de ciclodextrina**

25 1. Se preparó un octapéptido cíclico con la estructura ciclo(-DF-S-ΣR-DF-S-ΣR-) como una solución en transcutoal a una concentración de 5 mg/ml, donde Σ representa el aminoácido en asociación como un ácido L-alfa-aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación como un residuo de cadena lateral que consiste en una cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono.

30 2. Seis alícuotas separadas de 200 µl de la solución de la etapa 1 se transfirieron a viales frescos de 8 ml y se mezclaron con agitación lenta en vórtex con 800 µl de una solución de hidroxipropil-beta-ciclodextrina a una concentración de 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 o 1,5625 mg/ml en agua destilada.

35 2. Las células J774A.1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 5 x 10⁵ células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂/aire.

40 3. Al día siguiente, cada una de las soluciones de la etapa 1 se administraron en volúmenes adecuados a los pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 8, 4 o 2 µg/ml. Los pocillos restantes se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

45 4. A los pocillos con la solución de octapéptido se añadió lipopolisacárido (de la cepa 0111 B4 de *E. coli*), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración final del lipopolisacárido fue de 0,625 µg/ml.

5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

50 Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que la actividad del octapéptido en la supresión de la secreción de TNF estimulada por LPS estaba relacionada con la dosis.

Concentración de péptido (µg/ml)	Proporción entre ciclodextrina y el péptido en peso	Concentración de TNF (pg/ml)	Desviación típica
0	-	2519,3	64,4
2	40	2450,2	61,2
2	20	2223,9	37,4
2	10	2278,3	89,4
2	5	2177,2	110,9
2	2,5	2314,2	101,8
2	1,25	2161,8	94,7
4	40	1646,5	98,4
4	20	1488,1	16,6
4	10	1474,8	80,6
4	5	1477,6	33,2
4	2,5	1538,7	80,4
4	1,25	1599,9	106,4
8	40	1276,9	108,5
8	20	1298,4	17,3
8	10	1218,7	20,6
8	5	1140,6	34,5
8	2,5	1105,7	35,9
8	1,25	1130,9	71,8

5 Los resultados demuestran que la formulación del octapéptido con ciclodextrina da una inhibición significativa de la secreción de TNF hasta una concentración de 2 µg/ml en el pocillo de cultivo tisular y que esta inhibición se consigue sobre una amplia gama de concentraciones de ciclodextrina que varían desde 40:1 en peso:peso en orden descendente.

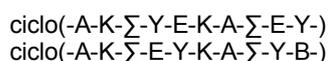
10 **Ejemplo 5. Efecto de un oligopéptido cíclico limitado internamente formulado con hidroxipropil beta-ciclodextrina y que contiene epítomos formados por los aminoácidos formadores de epítomo R-DF-S, en la supresión de la secreción de TNF estimulada por lipopolisacárido (LPS) en ratas**

- 15 1. Se preparó un octapéptido cíclico con la estructura ciclo(-DF-S-Σ-R-DF-S-Σ-R-), donde E representa el aminoácido en asociación como un ácido L-alfa-aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación como un residuo de cadena lateral que consiste en una cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono, como una solución en transcutole e hidroxipropil-beta-ciclodextrina, como se describe en el ejemplo 4, donde la concentración del péptido fue 1 mg/ml y la concentración final de ciclodextrina fue 40 mg/ml.
- 20 2. En ratas de 250 g de peso se inyectó i.p. 1 ml de la solución peptídica (1 mg de péptido por rata). Un segundo grupo de ratas recibió 1 ml del vehículo transcutole/ciclodextrina que no contenía péptido. Una hora después se inyectó a las ratas 1mg de lipopolisacárido (de *Salmonella abortus equi*).
3. 150 minutos después se extrajeron muestras de sangre y los niveles de TNF se midieron en los dos grupos mediante ELISA. Los resultados mostrados en la tabla siguiente demuestran que el péptido es capaz de inhibir la producción de TNF por las células en respuesta a un estímulo, dando una reducción superior al 75%.

	Vehículo	Péptido
TNF (pg/ml)	10717	2370
SD	6635	1831
Nº de animales por grupo	3	5

25 **Ejemplo 6. Supresión de la secreción de TNF mediante un análogo cíclico de Copaxone (acetato de glatiramer)**

- 30 1. Se prepararon dos oligopéptidos cíclicos con las estructuras siguientes:



35 Todos los aminoácidos están en forma L a menos que se indique lo contrario.
 Todos los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos.
 A, K, Y y E representan los aminoácidos formadores de epítomos y Σ representa el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación, donde el aminoácido en asociación es un ácido L-alfa-

aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación es un residuo de la cadena lateral que consiste en una cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono.

Los oligopéptidos cíclicos se prepararon como soluciones en hexafluoro-isopropanol (HFIP) a una concentración de 10 mg/ml, después se mezclaron con volúmenes iguales de la solución HFIP que contiene beta-hidroxipropil-ciclodextrina a una concentración de 50 mg/ml. Después, las soluciones orgánicas se secaron en nitrógeno y el complejo péptido/ciclodextrina se redisolvió en agua destilada para dar una concentración final del oligopéptido cíclico de 1 mg/ml.

2. Las células J774A.1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 3×10^5 células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂/aire.

3. Al día siguiente, las soluciones de la etapa 1 se administraron a pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 12,5 µg/ml del péptido. También se prepararon pocillos adicionales que contenían ciclodextrina sola a 62,5 µg/ml. El resto de los pocillos se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

4. A los pocillos con la solución del oligopéptido cíclico se añadió lipopolisacárido (de la cepa 0111 B4 de *E. coli*), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración final del lipopolisacárido fue de 0,1 µg/ml.

5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

Péptido (12,5 µg/ml)	LPS	Concentración de TNF (pg/ml)	Desviación típica
ciclo(-A-K-Σ-Y-E-K-A-Σ-E-Y)	+	486,9	33,5
ciclo(-A-K-Σ-E-Y-K-A-Σ-Y-E)	+	928,8	72,7
Ciclodextrina sola	+	622,3	22,9
Medio + LPS	+	637,6	26,0
Medio control	-	50,8	9,0

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla, demuestran que uno, pero no ambos, de los oligopéptidos cíclicos analizados tiene un efecto en la supresión de la secreción de TNF estimulada por LPS. De acuerdo con esto, la secuencia de los aminoácidos en cada dominio tiene un efecto sobre la actividad biológica del oligopéptido. Ciclo(-A-K-Σ-Y-B-K-A-Σ-B-Y) será útil en el tratamiento de la esclerosis múltiple, ya que comprende los mismos aminoácidos (excepto que en una configuración no aleatoria) que Copaxone y muestra el mismo efecto sobre la secreción de TNF por los macrófagos.

Ejemplo 7 – Inhibición de la actividad enzimática de la trombina

1. Se sintetizaron oligopéptidos cíclicos de las estructuras siguientes como se ha descrito anteriormente y se prepararon en forma de complejo con ciclodextrina a una concentración de 1 mg/ml de solución de sales equilibradas de Hanks usando el procedimiento indicado en el ejemplo 6.

(i) ciclo(-R-E-Σ-S-R-E-R-Σ-S-E-)

(ii) ciclo(-A-K-Σ-E-Y-K-A-Σ-Y-E-)

(iii) ciclo(-dF-R-C-S-dF-R-C-S-)

(iv) ciclo(-dF-S-C-R-dF-S-C-R-)

Todos los aminoácidos están en forma L a menos que se indique lo contrario.

Todos los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos.

Donde R, E, S, Y, K y A representan los aminoácidos formadores de epítopos, E representa el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación, donde el aminoácido en asociación es un ácido L-alfa-aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación es un residuo de la cadena lateral que consiste en una cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono y C representa cisteína, donde las cisteínas de cada anillo se oxidan para formar un puente interno.

2. En los pocillos de una microplaca de 394 pocillos se dispensaron 20 µl de la solución de trombina (0,01 mg/ml) y se mezclaron con 60 µl de la solución de oligopéptido cíclico.

3. A cada pocillo se añadieron 20 µl del sustrato boο-beta-bencil-Asp-Pro-Arg-7-amido-4-metilcoumarina clorhidrato (0,01 mg/ml) y se midió el tiempo de generación de sustrato.

4. A partir de los resultados mostrados en la tabla siguiente se puede ver que los oligopéptidos cíclicos estudiados tienen efectos diferenciales en la inhibición de la actividad proteolítica de la trombina y que estas actividades diferenciales están relacionadas con la naturaleza y la combinación de los aminoácidos incluidos en el anillo. Está claro que con la correcta elección de aminoácidos se pueden crear estructuras basadas en el molde del oligopéptido cíclico limitado que sean suficientemente rígidas para ejercer efectos significativos sobre la actividad de las enzimas.

De acuerdo con esto, los oligopéptidos cíclicos de acuerdo con la presente invención que tienen un efecto inhibidor de la actividad proteolítica de la trombina se pueden usar para tratar enfermedades donde la actividad de la proteasa sea un factor agravante, incluyendo enfermedades cardiovasculares, trastornos de la circulación y VIH.

Tiempo (minutos)	Inhibición de la actividad proteolítica de la trombina (unidades de fluorescencia-unidades arbitrarias)				
	Control (enzima sola)	(i)	(ii)	(iii)	(iv)
2,0	770,9	410,8	410,8	634,5	523,2
5,0	1821,1	816,4	818,4	1368,8	1205,3
10,0	2163,5	1189,4	1189,4	1786,9	1586,9
15,0	2253,2	1398,6	1398,6	1980,7	1751,7
20,0	2345,8	1592,1	1592,1	2107,4	1843,1
25,0	2359,0	1673,2	1673,2	2159,7	1864,8

A partir de la tabla se puede ver que algunos oligopéptidos cíclicos tenían mayor actividad que otros en función del orden de aminoácidos en cada dominio.

Ejemplo 8. Supresión de la secreción de TNF mediante oligopéptidos cíclicos que contienen dos epítosos diferentes

1. Se prepararon dos oligopéptidos cíclicos con las estructuras siguientes:

- (i) ciclo(-dF-S-Σ-Q-dL-S-Σ-R-)
- y
- (ii) ciclo(dF-S-Σ-L-dQ-S-Σ-R)

Todos los aminoácidos están en forma L a menos que se indique lo contrario. Todos los aminoácidos están unidos por enlaces peptídicos.

donde Q, L, S, R y F representan los aminoácidos formadores de epítosos y E representa el grupo funcional en asociación portado sobre el aminoácido en asociación, donde el aminoácido en asociación es un ácido L-alfa-aminocarboxílico y el grupo funcional en asociación es un residuo de la cadena lateral que consiste en una cadena alifática lineal que contiene diez átomos de carbono.

Estos oligopéptidos cíclicos se prepararon como soluciones en transcuto/ciclodextrina, como se describe en el ejemplo 4, para dar una concentración final del péptido de 1 mg/ml y ciclodextrina a 20 mg/ml.

2. Las células J774A.1 (una línea celular de macrófagos) se sembraron en todos los pocillos de tres placas de tipo clúster de 24 pocillos a una densidad de siembra de 3×10^5 células/ml/pocillo (1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 por pocillo) y se incubaron durante la noche a 37°C en 5% de CO₂/aire.

3. Al día siguiente, las soluciones de la etapa 1 se administraron a pocillos que contenían las células en la etapa 2, para dar tres pocillos, cada uno con una concentración final de 50, 25, 12,5, 6,25 o 3,125 µg/ml del oligopéptido cíclico. También se prepararon pocillos adicionales que contenían ciclodextrina a 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 mg/ml. El resto de los pocillos se dejaron sin tratar. La placa se incubó a 37°C durante cuatro horas adicionales.

4. A los pocillos con la solución de octapéptido se añadió lipopolisacárido (de la cepa 0111 B4 de *E. coli*), así como a tres de los pocillos que no habían recibido el péptido. La concentración final del lipopolisacárido fue de 0,1 µg/ml.

5. La placa se incubó durante la noche y al día siguiente se analizaron los sobrenadantes para detectar TNF usando un kit de ELISA comercial.

Los resultados obtenidos, mostrados en la tabla siguiente, demuestran que los oligopéptidos cíclicos que contienen dos epítosos no idénticos, de los cuales uno está compuesto por los aminoácidos F, R y S, son capaces de regular por disminución la secreción de TNF de las células J774 de un modo dependiente de la dosis.

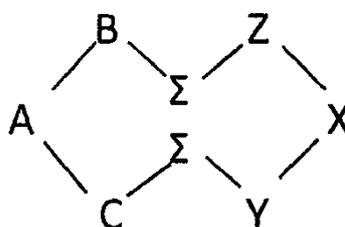
ES 2 459 020 T3

Conc. del péptido (µg/ml)	Medio control	Concentración de TNF (pg/ml)		
		(i)	(ii)	Ciclodextrina
0	27+3	2866*	2856*	2856*
3,125		2856*	2848 ± 43	2856*
6,25		2460 ± 83	2325 ± 67	2856*
12,5		1595 ± 64	1748 ± 20	2856*
25		1341 ± 50	1437 ± 85	2378 ± 21
50		843 ± 42	1081 ± 142	2225 ± 51

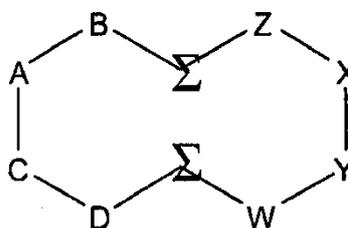
* Lecturas superiores al límite máximo detectable

REIVINDICACIONES

1. Un ensayo de detección selectiva para determinar la interacción entre un oligopéptido cíclico y un ligando diana, donde el oligopéptido cíclico es un oligopéptido cíclico limitado internamente que comprende un anillo de al menos seis aminoácidos para unirse específicamente a un ligando diana, donde el anillo comprende dos dominios de aminoácido, comprendiendo cada dominio aminoácidos formadores de epítipo y dos grupos funcionales en asociación que son las cadenas laterales de los aminoácidos en asociación o las cadenas laterales modificadas de los aminoácidos o grupos en asociación añadidos a la cadena lateral del aminoácido en asociación, donde los grupos funcionales en asociación están ubicados de modo que forman una o más asociaciones intracíclicas no covalentes; por medio del cual el oligopéptido cíclico está limitado en una conformación única de modo que los aminoácidos formadores de epítipo forman un epítipo en cada dominio, siendo cada epítipo capaz de unirse específicamente a un ligando diana; y donde el oligopéptido comprende dos epítipos; y cada grupo funcional en asociación es una cadena de hidrocarburo C_8-C_{20} que puede estar saturada o insaturada, una cadena lineal o una cadena ramificada y sustituida o insustituida; y donde el oligopéptido cíclico tiene la estructura seleccionada de las estructuras siguientes:



- donde A, B, C, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipos; A y X representan aminoácidos D y B, C, Y y Z representan aminoácidos L o A y X representan aminoácidos L y B, C, Y y Z representan aminoácidos D; se forma un epítipo con el dominio A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y; y cada Σ representa un aminoácido en asociación; y



- donde , B, C, D, W, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipo; se forma un epítipo con el dominio D-C-A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y-W; y cada Σ representa un aminoácido en asociación.

2. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con la reivindicación 1, donde cada dominio del oligopéptido cíclico comprende tres aminoácidos formadores de epítipo y los tres aminoácidos formadores de epítipo tienen configuraciones estereoquímicas alternas y/o donde los aminoácidos son aminoácidos de origen natural, análogos de aminoácidos o formas D de los mismos.

3. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde cada aminoácido formador de epítipo adyacente a un grupo funcional en asociación tiene la misma configuración estereoquímica que el grupo funcional en asociación adyacente.

4. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde los epítipos son iguales.

5. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde los aminoácidos en asociación son aminoácidos lipídicos, donde, opcionalmente, al menos uno de los grupos funcionales en asociación portados sobre los aminoácidos lipídicos es una cadena lateral de hidrocarburo de C_8-C_{20} o donde la cadena lateral del hidrocarburo lineal es una cadena lateral del hidrocarburo de $C_{10}-C_{16}$.

6. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4, donde el aminoácido en asociación es cisteína y el grupo funcional en asociación es una cadena de hidrocarburo alifático C_8-C_{20} unida al grupo sulfhidrido de la cadena lateral de la cisteína.

7. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio Z-X-Y y/o el dominio C-A-B se seleccionan de las secuencias de aminoácidos RFS, RSF, FSR, FRS, SRF,

SFR, QLS, QSL, SQL, SLQ, LQS o LSQ y cada Σ es un aminoácido lipídico con un grupo funcional en asociación de la cadena lateral de hidrocarburo lineal de C_{10} que comprende una cadena del hidrocarburo entre 8 y 20 carbonos de longitud.

5 8. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio Z-X-Y y/o el dominio C-A-B forman un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.

9. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio Z-X-Y es RFS y/o el dominio Z-X-Y y el dominio C-A-B forman cada uno un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.

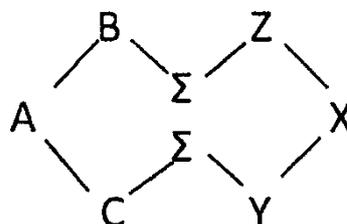
10. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con la reivindicación 9, donde la fenilalanina tiene una configuración D, la serina tiene una configuración L, la arginina tiene una configuración L y cada aminoácido lipídico tiene una configuración L.

11. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio C-A-B es igual al dominio Z-X-Y.

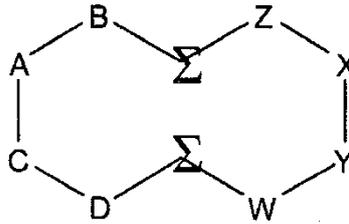
12. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con la reivindicación 1, donde el dominio Z-X-Y-W y/o el dominio D-C-A-B se seleccionan de las secuencias de aminoácidos YEKA, YEAK, YAKE, YAEK, YKAE, YKEA, EYKA, EYAK, EKAY, EKYA, EAKY, EAYK, KAYE, KAEY, KYAE, KYEA, KEAY, KEYA, AKEY, AKYE, AYEK, AYKE, AEYK o AEKY y cada Σ es un aminoácido lipídico con un grupo funcional en asociación en la cadena lateral de hidrocarburo lineal que comprende una cadena de hidrocarburo de una longitud de entre 8 y 20 carbonos; y donde, preferentemente, el dominio Z-X-Y-W es YEKA y el dominio D-C-A-B es EYAK y/o donde el dominio Z-X-Y-W y el dominio D-C-A-B forman cada uno un epítipo capaz de inhibir la actividad proteolítica y, opcionalmente, el dominio D-C-A-B es igual que el dominio Z-X-Y-W.

13. Un ensayo de detección selectiva de acuerdo con la reivindicación 1, donde el oligopéptido cíclico comprende los aminoácidos serina, fenilalanina y arginina como los aminoácidos formadores de epítipo en al menos uno de los dominios y cada dominio forma un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.

14. Un oligopéptido cíclico limitado internamente que comprende un anillo de al menos seis aminoácidos para unirse específicamente a un ligando diana, donde el anillo comprende dos dominios de aminoácido, comprendiendo cada dominio aminoácidos formadores de epítipo y dos grupos funcionales en asociación que son las cadenas laterales de los aminoácidos en asociación o las cadenas laterales modificadas de los aminoácidos o grupos en asociación añadidos a la cadena lateral del aminoácido en asociación, donde los grupos funcionales en asociación están ubicados de modo que forman una o más asociaciones intracíclicas no covalentes; por medio del cual el oligopéptido cíclico está limitado en una conformación única de modo que los aminoácidos formadores de epítipo forman un epítipo en cada dominio, siendo cada epítipo capaz de unirse específicamente a un ligando diana; y donde el oligopéptido comprende dos epítipos; y cada grupo funcional en asociación es una cadena de hidrocarburo C_8 - C_{20} que puede estar saturada o insaturada, una cadena lineal o una cadena ramificada y sustituida o insustituida; y donde el oligopéptido cíclico tiene la estructura seleccionada de las estructuras siguientes:



45 donde A, B, C, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipos; A y X representan aminoácidos D y B, C, Y y Z representan aminoácidos L o A y X representan aminoácidos L y B, C, Y y Z representan aminoácidos D; se forma un epítipo con el dominio A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y; y cada Σ representa un aminoácido en asociación; y el dominio Z-X-Y y/o el dominio C-A-B se selecciona de las secuencias de aminoácidos RFS, RSF, FSR, FRS, SRF, SFR, QLS, QSL, SQL, SLQ, LQS o LSQ y cada Σ es un aminoácido lipídico; y



- 5 donde , B, C, D, W, X, Y y Z representan los aminoácidos formadores de epítipo; se forma un epítipo con el dominio D-C-A-B y se forma un epítipo con el dominio Z-X-Y-W; cada E representa un aminoácido en asociación, donde el dominio Z-X-Y-W y/o el dominio D-C-A-B se selecciona de las secuencias de aminoácidos YEKA, YEAKE, YAKE, YAEK, YKAE, YKEA, EYKA, EYAK, EKAY, EKYA, EAKY, EAYK, KAYE, KAEY, KYAE, KYEA, KEAY, KEYA, AKEY, AKYE, AYEK, AYKE, AEYK o AEKY y cada Σ es un aminoácido lipídico.
- 10 15. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 14, donde cada dominio comprende tres aminoácidos formadores de epítipo y los tres aminoácidos formadores de epítipo tienen configuraciones estereoquímicas alternas y/o donde los aminoácidos son aminoácidos de origen natural, análogos de aminoácidos o formas D de los mismos.
- 15 16. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde cada aminoácido formador de epítipo adyacente a un grupo funcional en asociación tiene la misma configuración estereoquímica que el grupo funcional en asociación adyacente.
- 20 17. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 o 15, donde los epítipos son iguales.
- 25 18. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde el grupo funcional en asociación es una cadena lateral de hidrocarburo de C_8-C_{20} o donde la cadena lateral del hidrocarburo lineal es una cadena lateral del hidrocarburo de $C_{10}-C_{16}$.
- 30 19. Un aminoácido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 17, donde el aminoácido en asociación es cisteína y el grupo funcional en asociación es una cadena de hidrocarburo alifático C_8-C_{20} unida al grupo sulfhidrilo de la cadena lateral de la cisteína.
- 35 20. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, donde el dominio Z-X-Y y/o el dominio C-A-B forman un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.
- 40 21. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde el dominio Z-X-Y es RFS y/o donde el dominio Z-X-Y y el dominio C-A-B forman cada uno un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.
- 45 22. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 21, donde la fenilalanina tiene una configuración D, la serina tiene una configuración L, la arginina tiene una configuración L y cada aminoácido lipídico tiene una configuración L.
- 50 23. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el dominio C-A-B es igual al dominio Z-X-Y.
24. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con cualquiera la reivindicación 14, donde el dominio Z-X-Y-W es YEKA y el dominio D-C-A-B es EYAK y/o donde el dominio Z-X-Y-W y el dominio D-C-A-B forman cada uno un epítipo capaz de inhibir la actividad proteolítica y, opcionalmente, el dominio D-C-A-B es igual que el dominio Z-X-Y-W.
25. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende los aminoácidos serina, fenilalanina y arginina como los aminoácidos formadores de epítipo en al menos uno de los dominios y cada dominio forma un epítipo capaz de suprimir la secreción de TNF.
26. Un oligopéptido cíclico de acuerdo con las reivindicaciones 14 a 25 para uso como medicamento, profiláctico o diagnóstico.