

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 714 374**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.04.2009 PCT/EP2009/054171**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.10.2009 WO09124948**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2009 E 09730759 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2274321**

54 Título: **Derivados peptídicos de opiorfina como inhibidores potentes de ectopeptidasas degradadoras de encefalina**

30 Prioridad:

07.04.2008 US 42922

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

28.05.2019

73 Titular/es:

**INSTITUT PASTEUR (100.0%)
28, Rue du Docteur Roux
75724 Paris Cedex 15, FR**

72 Inventor/es:

ROUGEOT, CATHERINE

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 714 374 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

Derivados peptídicos de opiorfina como inhibidores potentes de ectopeptidasas degradadoras de encefalina

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

CAMPO DE LA INVENCION

10 **[0001]** La presente invención se refiere a péptidos opiorfina modificados como nuevos inhibidores de metalo-ectopeptidasas.

DESCRIPCIÓN DE LA TÉCNICA RELACIONADA

15 **[0002]** Las zinc metalo-ectopeptidasas controlan la actividad dependiente de receptor de mediadores neuronales y hormonales implicados en la regulación de funciones fisiológicas importantes en mamíferos. Se localizan en la superficie de células en tejidos nerviosos y sistémicos y catalizan el procesamiento postsecretor o metabolismo de neuropéptidos y péptidos reguladores (Roques, BP, Noble, F, Dauge, V, Fournie-Zaluski, MC y Beaumont, A. (1993) *Pharmacol Rev* 45, 87-146. Turner, AJ, Isaac, RE y Coates, D. (2001) *BioEssays* 23, 261-269).

20 **[0003]** Destacan entre estas señales peptídicas neuronales y/o hormonales la sustancia P (SP) y encefalinas, que están implicadas en la modulación dependiente de receptor de respuestas adaptativas de comportamiento a estímulos ambientales estresantes o amenazantes. Regulan de manera notable el procesamiento espinal de información nociceptiva y mecanismos analgésicos, respuestas emocionales y/o motivacionales, ansiedad, agresión, y fenómenos inflamatorios neuroinmunes (Dickenson, AH. (1995) *Br J Anaesth* 75, 193-200. Sora, I, Takahashi, N, Funada, M, Ujike, H, Revay, RS, Donovan, DM, Miner, LL y Uhl, GR. (1997) *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 1544-1549; Konig, M, Zimmer, AM, Steiner, H, Holmes, PV, Crawley, JN, Brownstein, MJ y Zimmer, A. (1996) *Nature* 383, 535-538; Filliol, D, Ghozland, S, Chluba, J, Martin, M, Matthes, HW, Simonin, F, Befort, K, Gaveriaux-Ruff, C, Dierich, A y LeMeur, M, y col. (2000) *Nat Genet* 25, 195-200).

30 **[0004]** Debido a la importancia fisiológica y al papel crucial de las zinc ectopeptidasas en la modulación de la potencia funcional de señales neuronales y hormonales corriente abajo, es esencial centrarse en lo que controla su actividad y, como consecuencia, la cascada reguladora en general. También es emocionante el descubrimiento de reguladores corriente arriba de actividad de ectopeptidasa desde los puntos de vista fisiopatológicos y terapéuticos debido al potencial para desarrollar nuevos candidatos a fármaco.

35 **[0005]** Un heptapéptido específico de cerebro llamado espinorfina se aisló y caracterizó a partir de médula espinal bovina con base en su actividad inhibidora hacia las ectoenzimas degradadoras de encefalina, tales como endopeptidasa (NEP; EC 3.4.24.11 [EC]) y aminopeptidasa N (AP-N; EC 3.4.11.2 [EC]) neutras (Nishimura, K y Hazato, T. (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 194, 713-719; Yamamoto, Y, Ono, H, Ueda, A, Shimamura, M, Nishimura, K & Hazato, T. (2002) *Curr Protein Pept Sci* 3, 587-599). Además, los autores de la invención caracterizaron sialorfina de rata, un mediador peptídico implicado en la adaptación a cambios ambientales en ratas. La sialorfina de rata es una señal peptídica endocrina cuya expresión se activa por medio de regulación andrógena y cuya secreción se estimula bajo una respuesta mediada por adrenérgicos al estrés ambiental en ratas macho. Es un inhibidor fisiológico de la actividad de NEP de rata anclada a membrana y es un inhibidor potente de la sensación de dolor en ratas (Rougeot, C, Rosinski-Chupin, I, Njamkepo, E & Rougeon, F. (1994) *Eur J Biochem* 219, 765-773; Rougeot, C, Vienet, R, Cardona, A, Le Doledec, L, Grognet, JM y Rougeon, F. (1997) *Am J Physiol* 273, R1309-R1320.; Rougeot, C, Rosinski-Chupin, I y Rougeon, F. (1998) en *Biomedical Reviews* eds. Chaldakov, GN y Mathison, R. (Bulgarian-American Center, Varna, Bulgaria,) Vol 9, pp. 17-32; Rosinski-Chupin, I, Hualme, JF, Rougeot, C y Rougeon, F. (2001) *Endocrinology* 142, 4550-4559; Rougeot, C, Messaoudi, M, Hermitte, V, Rigault, AG, Blisnick, T, Dugave, C, Desor, D & Rougeon, F. (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 8549-8554).

50 **[0006]** Previamente, los autores de la invención demostraron que el péptido nativo de opiorfina humana (péptido QRFSR), el primero caracterizado en seres humanos hasta la fecha, es un inhibidor dual eficaz de ectopeptidasas desactivadoras de encefalina, de endopeptidasa NEP (EC 3.4.24.11) y de aminopeptidasa AP-N (EC 3.4.11.2) neutras (Wisner y col. *Proc Natl Acad Sci USA*, Nov. 2006, 103(47): 17979-84).

[0007] Se han descrito previamente los derivados del péptido opiorfina, véase, por ejemplo, Wisner y col. *Proc Natl Acad Sci USA*, Nov. 2006, 103(47): 17979-84 y tienen la secuencia peptídica básica como QRFSR.

60 **[0008]** Por lo tanto, esta secuencia y la secuencia definida por la siguiente fórmula se pueden modificar: X1-X2-Arg-Phe-Ser-Arg, en la que X1 representa un átomo de H o un aminoácido Tir o Cis, X2 representa Gln o Glp cuando X1 es H, o X2 representa Gln cuando X1 es Tir o Cis. Se prefieren QRFSR, YQRFSR y/o CQRFSR con QRFSR como más preferidas. Se entiende que Glp es piroglutamato, Tir o Y es tirosina, Gln o Q es glutamina, Arg o R es arginina, Phe o F es fenilalanina, Ser o S es serina y Cis o C es cisteína. Estos péptidos se han descrito en la
65 solicitud de patente internacional publicada como WO2005090386.

RESUMEN DE LA INVENCION

[0009] La invención proporciona nuevos derivados de opiorfina y caracterización funcional *in vitro* al utilizar ensayos bioquímicos sumamente selectivos.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

[0010]

10

Figuras 1-4: la cinética de la hidrólisis de sustratos peptídico de FRET correspondientes por medio de hNEP o hAP-N recombinante en presencia de vehículo o en presencia de 50 μM de análogos peptídicos de QRFSR. Cada punto representa la intensidad de la señal expresada en URF (unidades relativas de fluorescencia), que fue proporcional a la cantidad de metabolitos formados, como función del tiempo de reacción (min).

15

Figura 5: inhibición por medio de análogos peptídicos de QRFSR de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada barra representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de 50 μM de análogos peptídicos de QRFSR.

20

Figura 6: inhibición por medio de análogos peptídicos de QRFSR de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada barra representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de 50 μM de análogos peptídicos de QRFSR.

25

Figuras 7-8: inhibición por medio de análogos peptídicos de QRFSR de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada barra representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de 50 μM de análogos peptídicos de QRFSR.

30

Figura 9: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido CQRFSR de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido CRFSR representado en la gráfica en μM (escala log).

35

Figura 10: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido QRFS[O-octanoil]R de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido QRFS[O-octanoil]R representado en la gráfica en μM (escala log).

40

Figura 11: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido Y(PE12)QRFSR (es decir, Y-[NH-(CH₂)₁₂-CO]-QRFSR) de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido Y(PE12)QRFSR representado en la gráfica en log μM .

50

Figuras 12-17: cinética de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o hAP-N recombinantes en presencia de vehículo o en presencia de 1 a 50 μM de análogos peptídicos de opiorfina CQRFSR o QRFS[O-octanoil]R. Cada punto representa la intensidad de la señal expresada en URF (unidades relativas de fluorescencia), que fue proporcional a la cantidad de metabolitos formados, como función del tiempo de reacción (min).

55

Figura 18: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido CQRFSR de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido CQRFSR representado en la gráfica en μM (escala log).

60

Figura 19: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido Y[PE12]RFSR-COOH (es decir, Y-(-HN-(CH₂)₁₂-CO)-)QRFSR) de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N

65

humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido Y(PE12)QRFSR-COOH representado en la gráfica en μM (escala log).

5

Figura 20: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido C[PE6]QRFSR-COOH (es decir, C-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRFSR) de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido C[PE6]QRFSR-COOH representado en la gráfica en μM (escala log).

10

Figura 21: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido C(PE12)QRFSR-COOH (es decir, C-(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)-QRFSR) de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido C(PE12)QRFSR-COOH representado en la gráfica en μM (escala log).

15

Figura 22: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido C[PE6]QRFS(O-Octanoil)R (es decir, C-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRF- S(O-octanoil)-R) de hidrólisis de sustratos peptídicos de FRET correspondientes por medio de hNEP o AP-N humanas recombinantes puras. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido C[PE6]QRFS(O-Octanoil)R representado en la gráfica en μM (escala log).

20

Figura 23: inhibición dependiente de concentración por medio de péptido C[PE6]QRFS(O-Octanoil)R (es decir, C-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRF- S(O-octanoil)-R) de hidrólisis del sustrato de NEP fisiológico de la sustancia P por medio de la NEP humana unida a la membrana expresada por medio de células epiteliales LNCaP en cultivo. Cada punto representa el porcentaje de sustrato intacto recuperado y calculado de la siguiente manera: porcentaje de velocidad sin inhibidor - velocidad en presencia de inhibidor / velocidad sin inhibidor, que se midió en ausencia o en presencia de varias concentraciones de péptido C[PE6]QRFS(O-Octanoil)R representado en la gráfica en nM (escala log).

30

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS REALIZACIONES PREFERIDAS

35

[0011] La invención de este documento proporciona versiones modificadas de estos péptidos donde cada uno o combinaciones de los residuos de aminoácidos que componen el péptido opiorfina se modifican con uno o más grupos funcionales.

40

[0012] Los péptidos opiorfina modificados tal como se describe en esta invención incluyen:

NH₂-QRFSR-CONH₂;

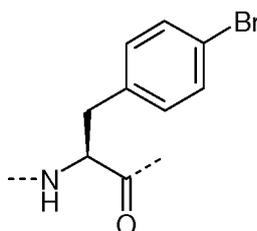
NH₂-QRGPR-COOH;

45

NH₂-QHNPR-COOH;

NH₂-QR(4BromoF)SR-COOH (es decir, NH₂-QR-F[4Br]-SR-COOH, en el que -F[4Br]- es una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye en la posición para por un átomo de bromo de modo que -F[4Br]- tiene la siguiente fórmula:

50



N-(acetil)QRFSR-COOH;

55

N-(C8-polietileno)QRFSR-COOH;

N-(biotina-C6)QRFSR-COOH;

ES 2 714 374 T3

NH₂-dRdSdFdRdQ-COOH (retroinversión de D-enantiómero); NH₂-YQRFSR-COOH;

NH₂-Y-(C₆-polietileno)QRFSR-COOH; NH₂-Y-(C₁₂-polietileno)QRFSR-COOH;

5 NH₂-QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH; NH₂-CQRFSR-COOH;

NH₂-CQRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH; NH₂-CQRF[S-O-C₁₂-polietileno]R-COOH;

NH₂-C-(C₈-polietileno)QRFSR-COOH;

10

NH₂-C-(C₁₂-polietileno)QRFSR-COOH;

NH₂-C-(C₈-polietileno)QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH; NH₂-[Cβ₂]QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH;

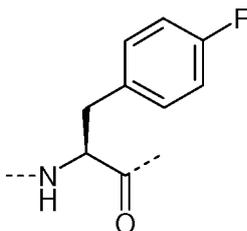
15 NH₂-C-(C₈-polietileno)QRFS [β₃R]-COOH NH₂-C[dQ]RF[S-O-C₈-polietileno][dR]-COOH;

NH₂-C-(C₈-polietileno)QRFS[dR]; NH₂-[dC]QRF[S-O-C₈-polietileno][dR]-COOH;

NH₂-[Cβ₂] QRF[S-O-C₈-polietileno][β₃R]-COOH; [CQRFSR]₂ como dipéptido cistina a través de enlace disulfuro; Glp-
20 RFSR-COOH;

NH₂-QRYSR-COOH;

25 NH₂-QRF[4F]SR-COOH, en la que -F[4F]- es una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye en la posición para por un átomo de flúor de modo que -F[4F]- tiene la siguiente fórmula:



NH₂-QKFSR-COOH;

30

NH₂-QRFSK-COOH;

NH₂-C-(C₆-polietileno)QRFSR-COOH; NH₂-C-(C₆-polietileno)-QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH;

35 NH₂-C-(C₁₂-polietileno)QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH;

NH₂-C[PE₁₂]QRF[S-O-C₈-polietileno]R-COOH;

40 NH₂-C-(C₁₂-polietileno)-QRF[S-O-C₈-polietileno]-β₃R-COOH; NH₂-C-(C₈-polietileno)-QRF[S-O-C₈-polietileno]-β₃R-COOH, en la que

Cβ₂ reemplaza un residuo de cisteína natural por β₂-cisteína que incorpora residuo de metileno adyacente al carbono Cα cerca del grupo α carbonilo de cisteína (H₂N(-CH₂-SH)-CH₂-CO-); β₃R reemplaza un residuo de arginina natural por β₃-arginina que incorpora residuo de metileno adyacente al carbono Cα cerca del grupo α amina de arginina (-NH-
45 CH₂-C[-(CH₂)₃-NH- C(NH)(NH₂)]-COOH);

[S-O-C₈-polietileno] y S(O-octanoil) significan una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo octanoilo;

[S-O-C₁₂-polietileno] significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo dodecanoilo;

50

polietileno C₆, C₈ o C₁₂ se corresponde con un espaciador de 6, 8 o 12 carbonos de etileno ((-HN-(CH₂)₆-CO-, -HN-(CH₂)₈-CO- y (-HN-(CH₂)₁₂-CO-, respectivamente).

[0013] En los péptidos anteriores, NH₂- representa la amina terminal del péptido y el COOH el ácido carboxílico
55 terminal (-CO-NH₂ cuando el grupo funcional terminal es una amida). La lista anterior se puede leer también de la siguiente manera:

- QRFSR- NH₂;
- QRGPR;
- 5 QHNPR;
- (acetil)QRFSR;
- 10 C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRFSR; biotina-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRFSR; dR-dS-dF-dR-dQ;
- YQRFSR;
- Y-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRFSR;
- 15 Y-(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)-QRFSR;
- QRF-S(O-octanoil)-R;
- CQRFSR;
- 20 CQRF-S(O-octanoil)-R;
- CQRF-S(O-dodecanoil)-R;
- 25 C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRFSR;
- C-(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)-QRFSR;
- 30 C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRF-S(O-octanoil)-R; [Cβ₂]QRF-S(O-octanoil)-R;
- C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRFS-[β₃R]
- C-[dQ]-RF-S(O-octanoil)-[dR];
- 35 C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRFS-[dR];
- [dC]-QRF-S(O-octanoil)-[dR];
- [Cβ₂]-QRF-S(O-octanoil)-[β₃R]
- 40 [CQRFSR]₂;
- Glp-RFSR;
- 45 QRYSR;
- QR-F[4F]-SR, en la que -F[4F]- es una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye en la posición para por un átomo de flúor;
- 50 QR-F[4Br]-SR, en la que -F[4Br]- es una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye en la posición para por un átomo de bromo;
- QKFSR;
- 55 QRFSK;
- C-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRFSR; C-(-HN-(CH₂)₆-CO-)-QRF-S(O-octanoil)-R;
- C(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)QRF-S(O-octanoil)-R; C-(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)-QRFS-dR;
- 60 C-(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)-QRF-S(O-octanoil)-β₃R;
- C-(-HN-(CH₂)₈-CO-)-QRF-S(O-octanoil)β₃R, en la que:
- 65 Cβ₂ es H₂N(-CH₂-SH)-CH₂-CO-;

β 3R es $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{C}[-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(\text{NH})(\text{NH}_2)]-\text{COOH}$;

-S(O-octanoil) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo octanoilo;

5

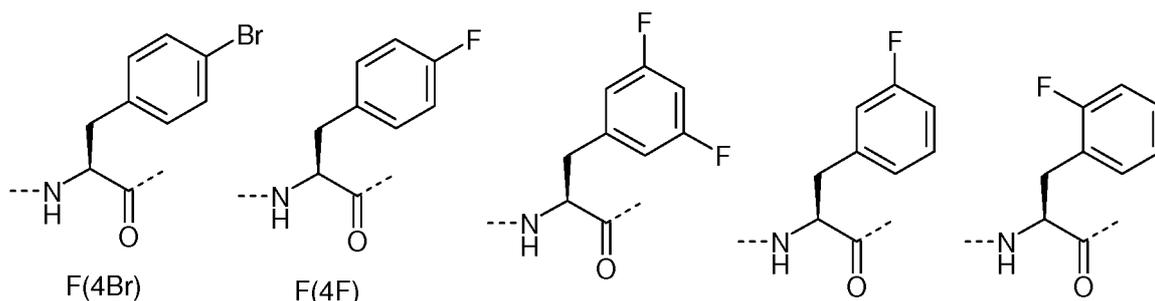
[0014] -S(O-octanoilo) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo dodecanoilo; Las siguientes definiciones se utilizan a lo largo de la presente solicitud.

[0015] Un «péptido» es una molécula que comprende una matriz lineal de residuos de aminoácidos conectados entre sí en la matriz lineal por medio de enlaces peptídicos. Una matriz lineal de este tipo puede ser opcionalmente cíclica, es decir, los extremos del péptido lineal o de las cadenas laterales de aminoácidos en el péptido se pueden unir, por ejemplo, por medio de un enlace químico. Los péptidos de este tipo pueden incluir además estructuras secundarias, terciarias o cuaternarias, al igual que asociaciones intermoleculares con otros péptidos u otras moléculas no peptídicas. Las asociaciones intermoleculares de este tipo pueden ser a través de, pero sin limitación, enlace covalente (por ejemplo, a través de enlaces disulfuro), o través de quelación, interacciones electroestáticas, interacciones hidrofóbicas, enlace de hidrógeno, interacciones ion-dipolo, interacciones dipolo-dipolo, o cualquier combinación de lo anterior.

[0016] Cualquier aminoácido de los siguientes péptidos puede estar en configuración L o configuración D. En particular, el péptido completo puede estar tanto en configuración L como D. La cadena de hidrocarburo puede contener opcionalmente un grupo de metileno adicional en comparación con el aminoácido natural, de modo que los aminoácidos pueden ser también β -aminoácidos, más precisamente, β 2- o β 3-aminoácidos. Por ejemplo, R puede representar uno de los siguientes aminoácidos: 1R (es decir, L-Arg), dR (es decir, D-Arg), β 3R o β 2R. Cualquier aminoácido de los siguientes péptidos puede ser también un aza-aminoácido o un β -aza-aminoácido.

25

[0017] «F(X)» significa una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye por uno o más átomos de halógeno, preferentemente flúor, el F(X) preferido tiene una de las siguientes fórmulas:



30

[0018] «S(O-alcanoilo)» significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo alcanoilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono (es decir, «alcanoilo»), preferentemente un grupo octanoilo o dodecanoilo. En la presente solicitud, S(O-C8-polietileno) o S(O-octanoil) significan una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo octanoilo.

35

[0019] «C-[enlazador]-» significa Cis-[NH-(CH₂)_n-CO]-, en la que n es un entero entre 1 y 20, preferentemente entre 4 y 15, 8 o 12 son particularmente preferidos. En la presente solicitud, «C-(C6-polietileno)» o «C[PE6]» significa Cis-[NH-(CH₂)₆-CO]-; «C-(C8-polietileno)» o «C[PE8]» significa Cis-[NH-(CH₂)₈-CO]-; y «C-(C12-polietileno)» o «C[PE12]» significa Cis-[NH-(CH₂)₁₂-CO]-.

40

[0020] «Y-[enlazador]-» significa Tir-[NH-(CH₂)_{n'}-CO]-, en la que n' es un entero entre 1 y 20, preferentemente entre 4 y 15, 8 o 12 son particularmente preferidos. En la presente solicitud, «Y-(C6-polietileno)» o «Y[PE6]» significa Tir-[NH-(CH₂)₆-CO]-; «Y-(C8-polietileno)» o «Y[PE8]» significa Tir-[NH-(CH₂)₈-CO]-; e «Y-(C12-polietileno)» o «Y[PE12]» significa Tir-[NH-(CH₂)₁₂-CO]-.

45

[0021] «Potencia inhibidora» de un derivado peptídico de la invención hacia una peptidasa particular se puede evaluar fácilmente por un experto en la técnica, por ejemplo, al medir tanto los valores K_i como valores IC₅₀. En particular, cuando se determinan valores IC₅₀, las potencias inhibidoras relativas de dos péptidos opiorfina modificados se pueden comparar al medir el valor IC₅₀ de cada péptido opiorfina modificado hacia una peptidasa dada, en condiciones experimentales dadas (mismo tampón, mismas concentraciones de peptidasa y sustrato), y al comparar dichos valores IC₅₀ de los péptidos opiorfina modificados con el valor IC₅₀ de opiorfina en las mismas condiciones experimentales.

50

[0022] La invención se refiere a un derivado peptídico de la fórmula (I):

55



en la que:

- 5 - ζ es un átomo de hidrógeno, tirosina, Y-[enlazador]-, una cisteína, o C-[enlazador],
- AA₁ es Q o Glp,
 - AA₂ es R,
- 10 - AA₃ es F o F(X),
- AA₄ es S(O-alcanoilo),
- 15 - AA₅ es R,
- C-[enlazador]- significa Cis-[NH-(CH₂)_n-CO]-, en la que n es un entero entre 1 y 20, n es preferentemente 6, 8 o 12,
 - Y-[enlazador]- significa Tir-[NH-(CH₂)_n-CO]-, en la que n' es un entero entre 1 y 20, n' es preferentemente 6, 8 o 12,
- 20 - F(X) significa una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye por uno o más átomos de halógeno,
- S(O-alcanoilo) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo alcanoilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono,
- 25 - cualquier aminoácido de dicho péptido puede estar independientemente tanto en configuración L como configuración D;

en la que, si el derivado peptídico comprende una cisteína, dicho derivado peptídico es opcionalmente un dímero.

30 **[0023]** En términos generales, en los derivados peptídicos según la invención, AA₁, AA₂, AA₃, AA₄ y AA₅ están independientemente tanto en configuración L como en configuración D.

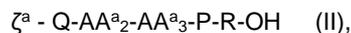
35 **[0024]** En una realización, el derivado peptídico comprende una cisteína y es un dímero en la que dos átomos de azufre o dos cisteínas se unen con un enlace disulfuro. Por ejemplo, [CQRFSR]₂ es el dímero del derivado peptídico de CQRFSR, cuyos aminoácidos cisteína se unen con un enlace disulfuro.

40 **[0025]** Los derivados peptídicos de la fórmula (I) son péptidos opiorfina modificados que tienen, de manera ventajosa, potencia inhibidora contra endopeptidasa NEP y/o aminopeptidasa AP-N neutras.

40 **[0026]** Los derivados peptídicos preferidos de la fórmula (I) son los siguientes:

QRFS(O-alcanoil)R, preferentemente QRFS(O-octanoil)R, C-[NH-(CH₂)₆-CO]-QRFS(O-alcanoil)R, preferentemente C-[NH-(CH₂)₆-CO]-QRFS(O-octanoil)R.

45 **[0027]** La solicitud describe un derivado peptídico de la fórmula (II):



50 en la que:

- ζ^a es un átomo de hidrógeno o un grupo quelante de Zn, tal como cisteína, C-[enlazador]-, N-acetilcisteína, N-mercaptoacetilo.

55 (HS-CH₂-CO-), ácido hidroxámico (HO-NH-CO-) o una hidroxiquinolina opcionalmente sustituida,

- AA^a₂ es R o H, preferentemente R,

- AA^a₃ es G, N, F o F(X), preferentemente F,

60 - dichos Q, AA^a₂, AA^a₃, P y R pueden estar independientemente tanto en configuración L como configuración D, y cualquiera de Q, AA₂, AA₃, P y R puede ser opcionalmente un β-aminoácido, un aza-aminoácido o un β-aza-aminoácido;

65 en la que, si el derivado peptídico comprende una cisteína, dicho derivado peptídico es opcionalmente un dímero, con

la condición de que el péptido no sea QHNPR o QRGPR.

[0028] Dicho derivado peptídico de la fórmula (II) es un péptido opiorfina modificado y es, de manera ventajosa, un inhibidor de AP-N humana. En particular, puede tener una potencia inhibidora hacia AP-N mayor (preferentemente al menos 6 veces, 8 veces o 10 veces) que su potencia inhibidora hacia la(s) actividad(es) de peptidasa NEP y/o carboxidipeptidasa.

[0029] Los derivados peptídicos preferidos de la fórmula (II) son los siguientes:

10 QRGPR,
QHNPR y
QRFPR.

15 **[0030]** En una realización, la invención se refiere a un derivado peptídico de la fórmula (III):



20 en la que:

- ζ^n es un átomo de hidrógeno, tirosina o Y-[enlazador]-,

- AA^1 es Q o Glp, preferentemente Q,

25 - AA^2 es R,

- AA^3 es F o F(X),

30 - AA^4 es S(O-alcanoilo),

- AA^5 es R,

35 - dichos AA^1 , AA^2 , AA^3 , AA^4 y AA^5 pueden estar independientemente tanto en configuración L como en configuración D.

[0031] Dicho derivado peptídico de la fórmula (III) es un péptido opiorfina modificado y es, de manera ventajosa, un inhibidor de NEP humana. En particular, puede tener una potencia inhibidora hacia la(s) actividad(es) de endopeptidasa NEP y/o carboxidipeptidasa mayor(es) (preferentemente al menos 6 veces, 8 veces o 10 veces) que su potencia inhibidora hacia AP-N.

[0032] En una realización, la invención se refiere a un derivado peptídico de la fórmula (IIIa):



45 en la que:

- AA^1 es Q o Glp,

50 - AA^3 es F o F(X),

- AA^5 es R.

[0033] Los derivados peptídicos preferidos de la fórmula (III) o (IIIa) son los siguientes:

55 QRFS(O-alcanoil)R, preferentemente QRFS(O-octanoil)R.

[0034] En una realización, la invención se refiere a un derivado peptídico de la fórmula (IV):



en la que:

- ζ^m es un átomo de hidrógeno, una cisteína o un C-[enlazador],

65

- AA^{m3} es F o F(X), preferentemente F(X),

- AA^{m4} es S(O-alcanoilo),

5 - dichos Q, R, AA^{m3}, AA^{m4} y R pueden estar independientemente tanto en configuración L como en configuración D;

en la que, si el derivado peptídico comprende una cisteína, dicho derivado peptídico es opcionalmente un dímero.

[0035] Los derivados peptídicos de la fórmula (IV) son péptidos opiorfina modificados que son, de manera
10 ventajosa, inhibidores duales de NEP humana y AP-N humana, a la vez que presentan una potencia inhibidora
significativa hacia tanto NEP humana como AP-N humana.

[0036] Los derivados peptídicos preferidos de la fórmula (IV) son los siguientes: C-[enlazador]-QRF-S(O-
15 octanoil)-R, preferentemente C-(-HN-(CH₂)₆-CO)-QRF-S(O-octanoil)-R, C-(-HN-(CH₂)₈-CO)-QRF-S(O-octanoil)-R o
C-(-HN-(CH₂)₁₂-CO)-QRF-S(O-octanoil)-R;

y QRFS(O-alcanoil)R, preferentemente QRFS(O-octanoil)R.

[0037] Preferentemente, los derivados peptídicos de la invención de este documento son péptidos opiorfina
20 modificados y tienen potencia inhibidora contra endopeptidasa NEP y/o aminopeptidasa AP-N neutras. De manera
más preferente, los péptidos opiorfina modificados de la invención tienen potencia inhibidora contra endopeptidasa
NEP y aminopeptidasa AP-N.

[0038] Los derivados peptídicos según la presente invención se pueden preparar de manera convencional por
25 medio de síntesis de péptidos en fase líquida o sólida por medio de acoplamientos sucesivos de los diferentes residuos
de aminoácidos que se van a incorporar (desde el extremo N-terminal al extremo C-terminal en fase líquida, o desde
el extremo C-terminal al extremo N-terminal en fase sólida) en los que los extremos N-terminal y las cadenas laterales
reactivas se bloquean previamente por medio de grupos convencionales.

30 **[0039]** Para síntesis de fase sólida, en particular, se puede utilizar la técnica descrita por Merrifield.
Alternativamente, también se puede utilizar la técnica descrita por Houbenweyl en 1974.

[0040] Las modificaciones a los péptidos opiorfina incluyen sustancias químicas (por ejemplo, que contienen
35 restos químicos adicionales, tales como metilo, polietileno C₂, C₄, C₆, C₈, C₁₀, C₁₂ y polietilenglicol de estos y/o formas
glicosiladas, y peptidomiméticos (por ejemplo, un compuesto de peso molecular bajo que imita a un péptido en
estructura y/o función (véase, por ejemplo, Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics, Londres: JAI Press
(1997); Gante, Peptidmimetica - massgeschneiderte Enzyminhibitoren Angew. Chem. 106: 1780-1802 (1994); y Olson
y col., J. Med. Chem. 36: 3039-3049 (1993)).

40 **[0041]** Otras modificaciones que se pueden introducir en los derivados peptídicos de la invención incluyen
utilizar aminoácidos no naturales, D-aminoácido, β₂-aminoácido, β₃-aminoácido, aza-aminoácido o β-aza-aminoácido
en lugar de L-aminoácido, restricciones conformacionales, reemplazo isostérico, ciclización, u otras modificaciones.
Otros ejemplos son aquellos donde uno o más enlaces amina se reemplazan por un enlace no amida, y/o una o más
45 cadenas laterales de aminoácidos se reemplazan por un resto químico diferente, o uno o más de los extremos N-
terminal, los C-terminal o una o más cadenas laterales se protegen por medio de un grupo protector, y/o enlaces
dobles y/o ciclización y/o estereoespecificidad se introducen en la cadena de aminoácidos para aumentar la rigidez
y/o afinidad de unión.

[0042] Con base en la estructura cristalina del dominio de unión de la metalo-ectopeptidasa dirigida por medio
50 del derivado peptídico de la invención, se pueden obtener también miméticos por medio de desarrollo de diseño de
fármacos asistido por ordenador (Oefner y col. J. Mol. Biol. (2000) 296(2):341-9; Gomeni y col. Eur. J. Pharm. Sci.
(2001) 13(3):261-70; Kan, Curr Top Med Chem (2002), 2(3):247-69).

[0043] Todavía otras modificaciones incluyen:

55

- proteger los grupos hidrofílicos NH₂ y COOH por medio de esterificación (COOH) con alcoholes lipofílicos o por
amidación (COOH) y/o por acetilación (NH₂) o añadir carboxialquilo o cadena hidrofóbica aromática al extremo terminal
NH₂;

60 - retroinvertir isómeros de los enlaces amida de CO-NH o metilación (o cetometileno, metilenoxi, hidroxietileno) de los
grupos amida;

- insertar restos -[HN-(CH₂)_n-CO]- entre dos aminoácidos, siendo n un entero de 1 a 20, preferentemente 6, 8 o 12.

65 **[0044]** La presente invención proporciona además anticuerpos, monoclonales o policlonales, o fragmentos de

estos que se dirigen específicamente contra (es decir, que reconocen específicamente) los péptidos opiorfina modificados descritos en esta invención. Los anticuerpos de este tipo son útiles, por ejemplo, para estudiar propiedades farmacocinéticas de los derivados peptídicos de la invención.

5 **[0045]** El término «anticuerpo» en sus varias formas gramaticales se utiliza en esta invención para referirse a moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de combinación de anticuerpo o paratopo. Las moléculas de anticuerpo ejemplares son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y porciones de una molécula de inmunoglobulina, incluidas aquellas porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', F(ab')₂ y F(v).

10

[0046] Los procedimientos para cultivar anticuerpos policlonales se conocen también. Típicamente, los anticuerpos de este tipo se pueden cultivar al administrar el derivado peptídico, incluido el derivado peptídico conjugado, de la presente invención por vía subcutánea a conejos de Nueva Zelanda blancos que se han sangrado primero para obtener suero preinmune. Los antígenos se pueden inyectar a un volumen total de 50 µl por sitio en diez 15 sitios diferentes o en al menos cinco sitios diferentes. Los conejos se sangran entonces cinco semanas después de la primera inyección y se refuerzan periódicamente con el mismo antígeno administrado por vía subcutánea en una concentración cinco veces inferior a la inyección primaria al máximo, dependiendo de la calidad de la respuesta inmune, tres veces cada tres semanas. Se recoge entonces una muestra de suero cada 10 días después de cada refuerzo. Se recuperan entonces los anticuerpos policlonales del suero por medio de cromatografía de afinidad 20 utilizando el antígeno correspondiente para capturar el anticuerpo. Este y otros procedimientos para cultivar anticuerpos policlonales se describen en E. Harlow, y col., editores, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Nueva York (1988).

[0047] Un «anticuerpo monoclonal», en sus varias formas gramaticales, se refiere a una población de 25 moléculas de anticuerpo que contiene solo una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunorreaccionar con un epítipo particular. Por consiguiente, un anticuerpo monoclonal presenta típicamente una única afinidad de unión para cualquier epítipo con el que inmunorreacciona. Por lo tanto, un anticuerpo monoclonal puede contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmunoespecífico para un epítipo diferente, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal biespecífico.

30

[0048] Los procedimientos de laboratorio para preparar anticuerpos monoclonales se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Harlow y col., *supra*). Los anticuerpos monoclonales (AcM) se pueden preparar al inmunizar un mamífero, por ejemplo, un ratón, rata, conejo, cabra, ser humano y similares, contra los derivados peptídicos de la presente invención, incluidos derivados peptídicos conjugados.

35

Las células productoras de anticuerpos en el mamífero inmunizado se aíslan y fusionan con células de mieloma o heteromieloma para producir células híbridas (hibridoma). Las células hibridoma que producen los anticuerpos monoclonales se utilizan como fuente del anticuerpo monoclonal deseado.

40 **[0049]** Ya que los AcM se pueden producir por cultivo de hibridoma, la invención no se debe limitar de esta manera. También se contempla el uso de AcM producidos por expresión de un ácido nucleico clonado a partir de un hibridoma. Esto es, el ácido nucleico que expresa las moléculas secretadas por un hibridoma se puede transferir a otra línea celular para producir un transformante. El transformante se distingue genotípicamente del hibridoma original pero también es capaz de producir las moléculas de anticuerpo de esta invención, incluidos fragmentos 45 inmunológicamente activos de moléculas enteras de anticuerpo, que se corresponden con aquellas secretadas por el hibridoma. Además, la bibliografía proporciona procedimientos para formar anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla y las variaciones similares en un fragmento de anticuerpo inmunorreactivo básico. Se considera que todos estos entran en el alcance de la invención en la medida que se describe y reivindica una clase y especificidad de anticuerpo, sin tener en cuenta la estructura de variante precisa que 50 un experto en la técnica pueda construir.

[0050] Los péptidos opiorfina modificados se pueden formular en composiciones farmacéuticas en asociación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas son adecuadas para administración vía tópica, oral, sublingual, parenteral, intranasal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, transcutánea 55 o intraocular y otras.

[0051] Los péptidos opiorfina modificados descritos anteriormente son útiles en el tratamiento de enfermedades y trastornos, en los que se busca una modulación de la actividad de una metalo-ectopeptidasa de membrana, más particularmente, una zinc metalo-peptidasa de membrana, tal como NEP y AP-N.

60

[0052] Los sustratos de NEP natural son principalmente las hormonas peptídicas: encefalinas, sustancia P, bradiquinina, angiotensina II y péptido natriurético atrial que desempeñan un papel importante en el control de la percepción de dolor central y periférico, fenómenos inflamatorios, intercambio mineral y/o tono arterial (Roques y col., *Pharmacol Rev.* 1993;45(1):87-146).

65

[0053] Más particularmente, la endopeptidasa neutra, NEP 24-11, se distribuye tanto en tejidos nerviosos como periféricos de mamíferos, y en la periferia es particularmente abundante en el riñón y la placenta. En estos tejidos, la metalopeptidasa de superficie celular NEP participa en el procesamiento postsecretorio y en el metabolismo de neuropéptidos, péptidos inmunorreguladores sistémicos y hormonas peptídicas. Al controlar los niveles activos de péptidos reguladores circulantes o secretados, NEP modula su acción fisiológica mediada por receptor. Por tanto, la NEP anclada a membrana está involucrada en la regulación de la actividad de: péptidos vasoactivos potentes tales como sustancia P, bradiquinina (QB), péptido natriurético atrial (PNA) y angiotensina II (All); péptidos inflamatorios/inmunorreguladores potentes tales como sustancia P y BQ y fMet-Leu-Phe (fMLP); neuropéptidos opioides potentes tales como Met y Leu-enkefalinas (Enk) y péptidos reguladores de homeostasis fluida y de intercambio mineral potentes tales como PNA, péptido natriurético de tipo C (PNC) y péptido natriurético de tipo B (PNB). Sin embargo, los niveles de estos péptidos cambian a través de la formación/degradación inducida por NEP solo en regiones donde se liberan tónicamente o donde su liberación se desencadena por un estímulo.

[0054] Desde un punto de vista integrante, la actividad biológica de NEP es controlar los niveles activos de señales peptidérgicas implicadas en regulación de presión arterial, en fenómenos inflamatorios, estados emocionales y en homeostasis agua-mineral, al igual que en el control de procesamiento del dolor. Desde un punto de vista clínico, esto confirma el hecho de que NEP es una diana farmacológica importante en varios estados de enfermedad. Por ejemplo, al inhibir NEP y APN, aumentando así los niveles y duración de la acción de opioides endógenos centrales y periféricos, se podría obtener un efecto analgésico o un efecto antidepressivo o psicoestimulante. La principal ventaja de modificar las concentraciones de péptidos reguladores endógenos por medio del uso de inhibidores de NEP y/o AP-N es que los efectos farmacológicos se inducen solo en sitios receptores activados por ligandos naturales, y dependen críticamente de su liberación tónica o provocada por estímulos que tiene lugar en situaciones estresantes ambientales, de comportamiento y fisiopatológicas (Roques y col., 1993).

[0055] Aparte de NEP, los ejemplos de metalopeptidasas de membrana de mamíferos son NEP 2, ECE (enzimas convertidoras de endotelina), en particular ECE1 y ECE2, el antígeno de superficie celular de eritrocitos KELL y el producto del gen PEX asociado con raquitismo hipofosfatémico ligado a X y AP-N (aminopeptidasa N).

[0056] NEP2 se distribuye específicamente en el sistema nervioso y en tejidos genitales.

[0057] AP-N es una enzima ubicua presente en una amplia variedad de órganos humanos, tejidos y tipos celulares (endotelial, epitelial, fibroblastos, leucocitos) y, en particular, es abundante en los riñones y el sistema nervioso central. Los sustratos identificados incluyen angiotensina III (Ang III); neuropéptidos, incluidas enkefalinas y endorfinas; y hormonas, incluidos kallidén y somatostatina. AP-N es una enzima multifuncional, relacionada con tumorigénesis, sistema inmune, dolor, regulación de la presión sanguínea arterial, etc. AP-N está involucrada también en el recorte de antígeno y el procedimiento de presentación de antígeno. Estas funciones facilitan la modulación de respuestas peptídicas bioactivas (gestión del dolor, liberación de vasopresina) y la influencia de funciones inmunes y acontecimientos biológicos importantes (proliferación celular, secreción, invasión, angiogénesis) proporcionando así opciones de tratamiento para muchos tipos de enfermedades.

[0058] La inhibición de ECE tiene una aplicación significativa en el tratamiento de hipertensión y en la prevención y tratamiento de aterosclerosis.

[0059] La inhibición de AP-N en conjunción con NEP tiene una aplicación significativa en el tratamiento del dolor y depresión, ansiedad, sedación y trastornos emocionales sociosexuales.

[0060] La inhibición de metalopeptidasas relacionadas con membrana tiene efectos terapéuticos en el tratamiento de tumores, concretamente, cánceres de ovario, colorrectales, cerebrales, pulmonares, de páncreas, gástricos y melanomas, y en la reducción de la incidencia de metástasis, aterosclerosis y/o hipertensión.

[0061] La inhibición de metalopeptidasas relacionadas con membrana tiene efectos en el alivio del dolor. Los efectos antinociceptivos de este tipo en dolor agudo son efectos analgésicos pero también son efectos en dolor inflamatorio crónico tales como artritis o enfermedad inflamatoria intestinal, lesión posoperatoria y dolor neuropático severo asociado o no a cáncer y/o a terapia para el cáncer.

[0062] Asimismo, se espera que la inhibición de metalopeptidasa bacteriana o vírica tenga efectos anti-infecciosos.

[0063] Las metalopeptidasas desempeñan un papel importante en la invasión tisular huésped patógeno y en procesos inmunológicos e inflamatorios, por ejemplo, aquellos de *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Legionella pneumophila*.

[0064] Asimismo, las metalopeptidasas bacterianas, especialmente zinc metalopeptidasas, desempeñan un papel importante en las enfermedades causadas por toxinas proteolíticas, tales como las toxinas de *B. anthracis* (factor letal del ántrax) y las neurotoxinas de *C. tetanum* y *botulinum*.

[0065] Otras metalopeptidasas desempeñan un papel importante en varias infecciones tales como infecciones causadas por el VIH (FR 2 707 169).

5 **[0066]** La importancia de los inhibidores de proteinasa para el tratamiento de enfermedades bacterianas o víricas se puede encontrar en J. Potempa y J. Travis.

[0067] Los diferentes papeles de metalopeptidasas se describen en Turner y col., 2001; Kenny y col., 1977; Kenny y col., 1987; Beaumont y col., 1996.

10

[0068] Un objetivo de la presente invención es proporcionar una terapia analgésica o antidepresiva con los péptidos opiorfina modificados que actúan inhibiendo NEP y AP-N en niveles periféricos, espinales y/o supraespinales y aumentan así los niveles y duración de la acción de opioides endógenos centrales o periféricos, incluidas encefalinas.

15 **[0069]** Se contempla el tratamiento del dolor, especialmente agudo y crónico, dolor inflamatorio visceral y neuropático.

[0070] El tratamiento de cualquier desequilibrio hidromineral es también un propósito de la invención. Entre los trastornos objetivo, se pueden citar trastornos óseos, de dientes, riñón, paratiroides, de páncreas, intestino, mucosa estomacal, próstata y glándula salival que son causados por desequilibrio hidromineral.

20

[0071] En particular, el desequilibrio se puede seleccionar de entre hiper o hipoparatiroidismo, osteoporosis, pancreatitis, litiasis de glándula submandibular, nefrolitiasis y osteodistrofia.

25 **[0072]** Es de interés adicional el tratamiento de trastornos interpersonales y de comportamiento alterados. Varios trastornos mentales se describen en la publicación internacional WO 02/051434.

[0073] En particular, la invención recoge cualquier trastorno seleccionado entre el grupo que consiste en trastorno por evitación, trastorno de consciencia disminuida, trastorno autístico, trastorno de hiperactividad y déficit de atención, trastorno de excitación sexual, hospitalismo, funcionamiento y relación interpersonal con el mundo exterior alteradas, trastorno de personalidad esquizoide, esquizofrenia, trastorno depresivo, interés reducido en el entorno, actividad social alterada ligada a la sexualidad, y comportamiento sexual alterado, incluidos eyaculación precoz, sexualidad hiperactiva y disfunción eréctil.

30

35 **[0074]** La invención también se refiere al uso de los péptidos y derivados peptídicos según la invención como agentes psicoestimulantes. Por consiguiente, la prevención o tratamiento de narcolepsia, hipersomnio, problemas compulsivos obsesivos, trastornos del estado de ánimo tales como trastornos depresivos o trastornos depresivos importantes, tanto trastornos depresivos importantes de un único episodio como trastornos depresivos importantes recurrentes, trastorno bipolar tipo I o II, trastorno distímico y trastorno ciclotímico.

40

[0075] Las enfermedades en las que se busca una modulación de metalopeptidasa de membrana incluyen también hipertensión, aterosclerosis, tumores, artritis inflamatoria y enfermedad intestinal.

45 **[0076]** También abarca el tratamiento de infecciones. Especialmente, la importancia de inhibidores de proteinasa para el tratamiento de enfermedades bacterianas o víricas se puede encontrar en J. Potempa y Travis.

[0077] Los péptidos opiorfina modificados descritos anteriormente son también útiles para controlar respuestas inmuno-inflamatorias.

50 **[0078]** Los péptidos opiorfina modificados tal como se describieron anteriormente son útiles también como agente natriurético o agente diurético.

[0079] Por consiguiente, la presente invención proporciona de manera ventajosa derivados peptídicos, tal como se definieron anteriormente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste en dolor, trastornos depresivos, actividad social alterada ligada a la sexualidad, y comportamiento sexual alterado.

55

[0080] Otro objetivo de la presente invención es el uso de los derivados peptídicos o ácidos nucleicos descritos anteriormente como sustitutos en el tratamiento de abuso de fármacos, especialmente abuso del fármaco morfina.

60

[0081] En efecto, los estudios han sugerido que la vulnerabilidad al abuso de fármacos y el desarrollo de la recompensa y dependencia de los fármacos es, al menos en parte, un resultado de modificaciones preexistentes o inducidas y/o defecto del sistema opioide endógeno. A este respecto, utilizar péptidos opiorfina modificados o ácidos nucleicos para potenciar los efectos de encefalinas endógenas reducirá los varios efectos secundarios (signos somáticos de abstinencia) producidos por la interrupción de administración crónica de morfina o de heroína.

65

[0082] Las enfermedades o trastornos preferidos que se pueden tratar con los derivados peptídicos de la invención incluyen dolor, trastornos depresivos, actividad social alterada ligada a la sexualidad, y comportamiento sexual alterado.

5

[0083] La invención se refiere además al uso de un agente que modula la interacción entre proteína BPLP endógena o producto de maduración, por ejemplo, opiorfina QRFSR natural y una metalopeptidasa de membrana para la preparación de una composición terapéutica para prevenir o tratar enfermedades en la que se busca una modulación de la actividad de dicha metalopeptidasa de membrana.

10

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Procedimientos para ensayos bioquímicos

15 **[0084]** Se llevó a cabo análisis cinético formal para cada ensayo utilizando control de fluorescencia en tiempo real de hidrólisis de sustrato específico. Para cada modelo fluorimétrico adaptado de 96 pocillos, todos los parámetros que permitían el análisis de la actividad enzimática de NEP humana y AP-N humana se definieron bajo condiciones de medición de la velocidad inicial.

20 1- *Fuentes de las ectopeptidasas humanas, hNEP y nAP-N*

[0085] NEP humana recombinante y AP-N humana recombinante (libres de sus respectivos citosoles N-terminal y segmento transmembrana), que se compraron a R&D Systems, se utilizaron como fuente pura de peptidasa.

25 2- *Sustratos e inhibidores sintéticos*

[0086] Actividades de peptidasa *in vitro*, amino, carboxidi y endo se sometieron a ensayo al medir la descomposición de los siguientes sustratos sintéticos selectivos:

30 - el péptido FRET Abz-dR-G-L-EDDnp, que es un sustrato fluorescente desactivado internamente específico para actividad de endopeptidasa NEP, se sintetizó por Thermo-Fisher Scientific (Alemania).

- el péptido FRET Abz-R-G-F-K-DnpOH, que es un sustrato fluorescente desactivado internamente específico para actividad de endopeptidasa NEP, se sintetizó por Thermo-Fisher Scientific (Alemania).

35

- el péptido FRET Mca-R-P-P-G-F-S-A-F-K-(Dnp)-OH (Mca-BK2), que es un péptido fluorogénico intramolecularmente desactivado relacionado estructuralmente con la bradiquina, que es un sustrato selectivo para medir la actividad de NEP y ECE, se compró a R&D Systems.

40 **[0087]** FRET es la transferencia de energía por resonancia de fluorescencia de un fluoróforo donante (Abz=orto-aminobenzoílo o Mca=7-metoxicoumarin-4-il-acetilo) a un fluoróforo aceptor (DnpOH=2,4-dinitrofenilo o EDDnp=etilendiamina de 2,4-dinitrofenilo).

- L-alanina-Mca, Ala-Mca, un sustrato fluorogénico para medir la actividad de aminopeptidasa se compró a Sigma.

45

[0088] Al medir la tasa de hidrólisis de estos sustratos por medio de ectopeptidasas solubles en presencia o ausencia de diferentes inhibidores de peptidasa sintéticos selectivos disponibles, se evaluó la especificidad de cada ensayo enzimático: -Tiorfan (inhibidor de NEP) (Bachem), - bestatina (inhibidor de AP) (Calbiochem).

50 3- *Medición de actividades de peptidasa utilizando ensayos fluorimétricos adaptados de 96 pocillos*

[0089] Según las condiciones de medición de la velocidad inicial: el tiempo, pH y temperatura de incubación al igual que concentraciones de enzima y sustrato se definieron para cada ensayo. Se midió la hidrólisis de sustratos por control en tiempo real de su tasa de metabolismo por medio de las dos peptidasas en presencia o ausencia de compuesto inhibidor sometido a prueba (las concentraciones oscilaban de 1 a 50 μ M). Se añadieron estos al medio de preincubación. La tasa de fondo de la autólisis de sustrato que representaba la señal fluorescente obtenida en ausencia de enzima se sustrajo para calcular las velocidades iniciales en URF (unidades relativas de fluorescencia)/min

60

[0090] *Medición de actividad de endopeptidasa NEP utilizando sustrato peptídico específico de FRET, Abz-dR-G-L-EDDnp* Utilizando una microplaca de 96 pocillos de media área negra, la reacción estándar consistió en enzima (12,5 ng) en 100 μ M de Tris-HCl pH 7 que contenía 200 mM de NaCl (volumen final de 100 μ l). El sustrato (concentración final de 15 μ M) se añadió después de preincubación durante 10 min a 28 °C y la cinética de aparición de la señal fluorescente (URF) se analizó directamente durante 40 min a 28 °C (mediciones sucesivas en intervalos de 2,3 min) utilizando un lector de microplacas fluorímetro (monocromador Infinite 200- Tecan) a unas longitudes de

65

onda de excitación y emisión de 320 nm y 420 nm, respectivamente.

[0091] En condiciones de medición de la velocidad inicial, la intensidad de la señal fue directamente proporcional a la cantidad de metabolitos formados durante el periodo de tiempo de 20-40 min de la reacción. Por consiguiente, en ausencia de inhibidor, la velocidad inicial de endoproteólisis específica mediada por rhNEP de Abz-dR-G-L-EDDnp se midió a partir de la regresión lineal (pendiente = actividad de NEP en presencia de vehículo / tiempo de incubación) como 8218 ± 2878 URF/min/mg rhNEP, n=3 determinaciones independientes.

[0092] *Medición de actividad de carboxidipeptidasa NEP utilizando sustrato peptídico específico de FRET, Abz-R-G-F-K-Dn- pOH* Utilizando una microplaca de 96 pocillos de media área negra, la reacción estándar consistió en enzima (2,5 ng) en 100 mM de Tris-HCl pH 6,5 que contenía 50 mM de NaCl (volumen final de 100 μ l). El sustrato (concentración final de 4 μ M) se añadió después de preincubación durante 10 min y la cinética de aparición de la señal fluorescente (URF) se analizó directamente durante 40 min a 28 °C (mediciones sucesivas en intervalos de 2,3 min) utilizando un lector fluorímetro a unas longitudes de onda de excitación de 320 nm y emisión de 420 nm. En estas condiciones de medición de la velocidad inicial, la hidrólisis específica mediada por NEP de Abz- R-G-F-K-DnpOH se evaluó a 59796 ± 18685 URF/min/ μ g rhNEP, n= 4 determinaciones independientes. La actividad de carboxidipeptidasa NEP sometida a ensayo con el sustrato Abz-R-G-F-K-DnpOH se refirió como «actividad de NEP-CDP1» en las Figuras 5-8.

[0093] Además, el péptido fluorogénico intramolecularmente desactivado, Mca-BK2 (10 μ M), se sometió a hidrólisis por 5 ng de rhNEP en las mismas condiciones experimentales a las descritas anteriormente. En estas condiciones, la enzima hNEP actuó sobre Mca-R-P-P-G-F-S-A-E-K(Dnp)-OH principalmente como una carboxidipeptidasa que escinde preferentemente el enlace A-F pero también como una endopeptidasa que escinde el enlace G-F. En condiciones de medición de la velocidad inicial, la hidrólisis específica mediada por NEP de Mca-BK2 se evaluó a 121910 ± 24755 URF/min/ μ g rhNEP, n= 3 determinaciones independientes. La actividad de carboxidipeptidasa NEP sometida a ensayo con el sustrato Abz-R-G-F-K-DnpOH se refirió como «actividad de NEP-CDP2» en las Figuras 5-8.

[0094] *Medición de actividad de ectopeptidasa AP-N utilizando sustrato Ala-Mca* Utilizando una microplaca de 96 pocillos de media área negra, la reacción estándar consistió en enzima (4 ng) en 100 mM de Tris-HCl pH 7,0 (volumen final de 100 μ l). El sustrato Ala-Mca (concentración final de 25 μ M) se añadió después de preincubación durante 10 min a 28 °C y la cinética de aparición de la señal se controló durante 40 min a 28 °C utilizando un lector fluorímetro a unas longitudes de onda de excitación de 380 nm y emisión de 460 nm. La intensidad de la señal fue directamente proporcional a la cantidad de metabolitos formados durante el periodo de tiempo de 10-40 min de la reacción. En estas condiciones de medición de la velocidad inicial, la aminoproteólisis mediada por AP-N humana de Ala-Mca se calculó directamente (desde la pendiente: actividad de AP-N en ausencia de inhibidor en función del tiempo de incubación) como 147042 ± 44657 URF/min/mg rhAP-N, n = 3 determinaciones independientes.

Otros sustratos peptídicos de FRET para someter a ensayo la actividad de carboxidipeptidasa NEP se han descrito en Barros y col. Biol. Chem., 2007, 388:447-455.

Ejemplo 2: Resultados de ensayos bioquímicos 1- Cribado de derivados peptídicos de opiorfina en hNEP y hAP-N

[0095] Los compuestos se examinaron por triplicado en una concentración final de 50 μ M.

[0096] Las Figuras 1 a 9 presentan los resultados de ensayos bioquímicos en actividades de endopeptidasa NEP y carboxidipeptidasa y actividad de AP-N con varios derivados peptídicos de la invención.

[0097] Varios análogos peptídicos de opiorfina se examinaron para su potencia inhibidora hacia las dos ectoenzimas ancladas a membrana, NEP (actividades específicas de endopeptidasa y carboxidipeptidasa) y APN utilizando ensayos enzimáticos selectivos basados en fluorescencia: los modelos enzimáticos *in vitro* basados en FRET desarrollados previamente y validados en el laboratorio (solicitud PCT depositada el 18 de enero de 2009).

[0098] Se analizaron los siguientes compuestos. En los siguientes péptidos, NH₂- representa la amina terminal del péptido y el COOH el ácido carboxílico terminal del péptido.

- NH₂-QRFSR-CONH₂; NH₂-QRGPR-COOH; NH₂-QHNPR-COOH; NH₂-QR(4BromoF)SR-COOH (es decir, QRF(4Br)SR); NH₂-QRFPR-COOH: presentaron preferencia inhibidora por AP-N humana y una potencia inhibidora débil hacia NEP humana.

- N-(acetil)QRFSR-COOH; N-(C8-polietileno)QRFSR-COOH; N-(biotina-C6-polietileno)QRFSR-COOH : presentaron potencia inhibidora débil hacia AP-N y NEP humanas con una preferencia por la actividad de endopeptidasa NEP

- NH₂-dRdSdFdRdQ-COOH (retroinversión de D-enantiómero): no presentó una actividad inhibidora significativa hacia AP-N y NEP humanas con una preferencia por la actividad de AP-N

- NH₂-YQRF_{SR}-COOH; NH₂-Y-(C6-polietileno)QRF_{SR}-COOH; NH₂-Y-(C12-polietileno)QRF_{SR}-COOH: presentaron preferencia inhibitora por actividad de endopeptidasa NEP humana, en particular, Y-(C12-polietileno)QRF_{SR}

5 - NH₂-QRF[S-O-C8-polietileno]R-COOH; NH₂-CQRFSR-COOH: fueron inhibidores duales potentes de NEP humana (actividades específicas de endopeptidasa y carboxidipeptidasa) y AP-N.

[0099] Otros péptidos opiorfina modificados son los siguientes:

10 NH₂-CQRF[S-O-C8-polietileno]R-COOH;

NH₂-CQRF[S-O-C12-polietileno]R-COOH NH₂-C-(C8-polietileno)QRF_{SR}-COOH;

NH₂-C-(C12-polietileno)QRF_{SR}-COOH; NH₂-C-(C8-polietileno)-QRF[S-O-C8-polietileno]R-COOH;

15 NH₂-[Cβ₂]QRF[S-O-C8-polietileno]R-COOH NH₂-C-(C8-polietileno)QRF[Sβ_{3R}]-COOH NH₂-C[dQ]RF[S-O-C8-polietileno][dR]-COOH

NH₂-C-(C8-polietileno)QRF[SdR]; NH₂-[dC]QRF[S-O-C8-polietileno][dR]-COOH

20 NH₂-[Cβ₂]QRF[S-O-C8-polietileno][β_{3R}]-COOH

[CQRFSR]₂ como dipéptido cistina a través de enlace disulfuro.

25 *2- Inhibición dependiente de concentración de derivados peptídicos de opiorfina seleccionados en hNEP y hAP-N*

Péptido CQRFSR-COOH (Figuras 9 y 18)

[0100] El péptido CQRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,97$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $7 \pm 3 \mu\text{M}$.

[0101] El péptido CQRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $6 \pm 1 \mu\text{M}$.

[0102] El péptido CQRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 30$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

[0103] El péptido CQRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión del péptido FRET Mca-R-P-P-G-F-S-A-F- K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 16$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $17 \pm 2 \mu\text{M}$.

[0104] Por lo tanto, la modificación de la posición N-terminal del péptido NH₂-QRF_{SR} por formación de enlace amida con un aminoácido cisteína (el grupo funcional tiol es un grupo quelante fuerte de Zn) llevó a un compuesto (péptido CQRFSR) a presentar potencia inhibitora reforzada hacia hAP-N (10 veces en comparación con el péptido nativo QRF_{SR}) y hacia hNEP (5 veces).

Péptido QRFS[O-octanoil]R (Figura 10)

50 **[0105]** El péptido QRFS[O-octanoil]R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,98$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $2,8 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

[0106] El péptido QRFS[O-octanoil]R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $12 \pm 5 \mu\text{M}$.

[0107] El péptido QRFS[O-octanoil]R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 20$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $10 \pm 1 \mu\text{M}$.

60 **[0108]** El péptido QRFS[O-octanoil]R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión del péptido FRET Mca-R-P-P-G-F-S-A-F- K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC₅₀ a $14 \pm 4 \mu\text{M}$.

65 **Péptido Y-[espaciador amino-ácido-dodecanoico]-QRF_{SR}** (Figuras 11 y 19)

[0109] El péptido Y(PE12)QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,98$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a $10 \pm 1 \mu\text{M}$.

5

[0110] El péptido Y(PE12)QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a $24 \pm 2 \mu\text{M}$.

10 **[0111]** El péptido Y(PE12)QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 20$ puntos de determinación, con un IC50 a $122 \pm 20 \mu\text{M}$.

[0112] El péptido Y(PE12)QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión del péptido FRET Mca-R-P-P-G-F-S-A-F- K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a $31 \pm 2 \mu\text{M}$.

15

Por consiguiente, se confirmó la preferencia inhibitoria para actividad de endopeptidasa NEP humana de Y-(C12-polietileno)QRFSR.

20 **Péptido C[PE6]QRFSR** (PE6=amino-ácido-hexanoico) (Figura 20)

[0113] El péptido C[PE6]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,98$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a $40 \pm 5 \mu\text{M}$.

25

[0114] El péptido C[PE6]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a aproximadamente 217.

30 **[0115]** El péptido C[PE6]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 20$ puntos de determinación, con un IC50 a $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

[0116] El péptido C[PE6]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión del péptido FRET Mca-R-P-P-G-F-S-A-F- K-(Dnp)-OH (Mca-BK2) mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 18$ puntos de determinación, con un IC50 a aproximadamente 227 μM .

35

Péptido C-[espaciador amino-ácido-dodecanoico]-QRFSR (Figura 21)

[0117] El péptido C[PE12]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,96$, $n = 24$ puntos de determinación, con un IC50 a $5,7 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

40

[0118] El péptido C[PE12]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,97$, $n = 30$ puntos de determinación, con un IC50 a $19 \pm 2 \mu\text{M}$.

45

[0119] El péptido C[PE12]QRFSR-COOH evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,98$, $n = 27$ puntos de determinación, con un IC50 a $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

50 **Péptido C-[espaciador amino-ácido-dodecanoico]-QRFS[C]-octanoil]R** (Figura 22)

[0120] El péptido C[PE6]QRFS(O-octanoil)R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 27$ puntos de determinación, con un IC50 a $759 \pm 56 \text{ nM}$.

55

[0121] El péptido C[PE6]QRFS(O-octanoil)R evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 27$ puntos de determinación, con un IC50 a $848 \pm 58 \text{ nM}$.

60 **[0122]** El péptido C[PE6]QRFS(O-octanoil)R evitó de una manera dependiente de concentración que la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 24$ puntos de determinación, con un IC50 a $1,7 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

[0123] En un ensayo *in vitro* relevante biológicamente, utilizando el sustrato de NEP fisiológico de sustancia P y membranas celulares humanas como fuente de hNEP, el derivado peptídico C[PE6]QRFS(O-octanoil)R evitó de una

65

manera dependiente de concentración la escisión de sustancia P mediata por la actividad de endopeptidasa hNEP unida a membrada: $r^2 = 0,95$, $n = 13$ puntos de determinación, con un IC50 a $1,6 \pm 0,4 \mu\text{M}$ (aumento de al menos 5 veces la potencia inhibidora en comparación con el péptido nativo opiorfina para la misma prueba) (Figura 23).

5 **Dipéptido [CQRFSR] ([CQRFSR]₂)**

[0124] El dipéptido [CQRFSR] evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-dR-G-L-EDDnp mediada por la actividad de endopeptidasa rhNEP: $r^2 = 0,87$, $n = 24$ puntos de determinación, con un IC50 a $1,4 \pm 0,5 \mu\text{M}$.

10

[0125] El dipéptido [CQRFSR] evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Abz-R-G-F-K-DnpOH mediada por la actividad de rhNEP: $r^2 = 0,99$, $n = 27$ puntos de determinación, con un IC50 a $3,3 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

[0126] El dipéptido [CQRFSR] evitó de una manera dependiente de concentración la escisión de Ala-AMC mediada por la actividad de rhAP-N: $r^2 = 0,99$, $n = 24$ puntos de determinación, con un IC50 a $0,8 \pm 0,1 \mu\text{M}$.

15

Tabla 1: resumen de valores IC50 de varios péptidos y derivados peptídicos en actividades de NEP y AP-N

Derivados de opiorfina	IC50, μM hacia hAP-N	IC50, μM hacia endopeptidasa hNEP	IC50, μM hacia carboxidipeptidasa hNEP
Y-[PE12]QRFSR	122 ± 20	10 ± 1	$24 \pm 2 / 31 \pm 2$
QRFS[O-octanoil]R	10 ± 1	$2,8 \pm 0,2$	$12 \pm 5 / 14 \pm 4$
CQRFSR	$0,8 \pm 0,1$	7 ± 3	$6 \pm 1 / 17 \pm 2$
C-[PE6]-QRFSR	$0,8 \pm 0,1$	40 ± 5	~ 220
C-[PE12]-QRFSR	$0,8 \pm 0,1$	$5,7 \pm 0,5$	19 ± 2
Derivados de opiorfina	IC50, μM hacia hAP-N	IC50, μM hacia endopeptidasa hNEP	IC50, μM hacia carboxidipeptidasa hNEP
C-[PE6]-QRFS[O-octanoil]R	$1,7 \pm 0,1$	$0,76 \pm 0,06$	$0,85 \pm 0,06$
[CQRFSR] ₂	$0,8 \pm 0,1$	$1,4 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,2$

[0127] Todos los datos juntos mostraron la importancia del grupo α amino N-terminal del péptido NH₂-QRFSR para la potencia inhibidora de opiorfina hacia AP-N humana.

20

[0128] En efecto, en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR, su acetilación (Ac-QRFSR) o ciclización (pGlu-RF-SR), su octanoilización (octanoil-Q RFSR) o biotilación (biotina-C6)QRFSR llevó a los compuestos a presentar una potencia inhibidora débil hacia hAP-N.

25

[0129] Sin embargo, en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR, los dos compuestos: pGlu-RFSR y octanoil-QRF-SR presentaron potencia inhibidora al menos equivalente, si no mejor, para hNEP humana.

[0130] Estos datos demuestran además la importancia del extremo carboxilo libre del péptido QRFSR-COOH para su potencia inhibidora hacia hNEP, especialmente hacia la actividad de carboxidipeptidasa de NEP en comparación con el péptido opiorfina (QRFSR) nativo, la amidación (QRFSR-CONH₂) llevó a un compuesto a presentar una potencia inhibidora débil hacia actividad de hNEP.

30

[0131] El residuo Phe del péptido QRFSR es importante para la potencia inhibidora de opiorfina hacia actividades de peptidasa hNEP y hAP-N. En efecto, en comparación con el péptido nativo opiorfina (QRFSR), la sustitución del residuo Tir por Phe (QRYSR) llevó a un compuesto a presentar una disminución de 6 veces en potencia inhibidora para hAP-N y una ligera reducción de la potencia inhibidora hacia NEP humana.

35

[0132] Sin embargo, de manera interesante, la sustitución del residuo 4-fluoro-Phe por Phe (QR[4F]FSR) llevó a un compuesto a presentar solo una disminución de 2 veces en potencia inhibidora hacia hNEP y una potencia inhibidora equivalente hacia hAP-N en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR. Por el contrario, la sustitución del residuo (4-fluoro-Phe) por Phe (QR[4Br]FSR) llevó a un compuesto a presentar una potencia inhibidora débil hacia NEP humana.

40

[0133] La modificación de los residuos centrales RFS del péptido QRFSR afecta a la potencia inhibidora de opiorfina hacia hNEP, ya que, en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR, los compuestos QRGPR,

45

QHNPR y QRFPR presentaron potencia inhibidora equivalente para AP-N humana y una potencia inhibidora débil hacia NEP humana.

- 5 **[0134]** Los resultados demuestran la importancia del ion guanidino del residuo Arg en la posición 2 del péptido QRFSR para la potencia inhibidora de opiorfina hacia hAPN. En comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR, la sustitución de una ϵ -amina del residuo Lis (QKFSR) por Arg2 llevó a un compuesto a presentar una disminución superior a 10 veces en potencia inhibidora hacia nAP-N y una ligera reducción de la potencia inhibidora hacia NEP humana.
- 10 **[0135]** De manera similar, el ion guanidino del residuo Arg en la posición 5 del péptido QRFSR es importante para la potencia inhibidora de opiorfina hacia hAPN, en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR, la sustitución de una ϵ -amina del residuo Lis por Arg5 (QKFSR) llevó a un compuesto a presentar una disminución de 10 veces en potencia inhibidora para nAP-N y una potencia inhibidora equivalente para NEP humana.
- 15 **[0136]** De manera interesante, la esterificación del grupo hidroxilo del residuo de serina del péptido QRFSR por ácido octanoico (QRF[octanoil-serina]R) llevó a un compuesto a presentar potencia inhibidora equivalente hacia hAP-N en comparación con el péptido nativo opiorfina-QRFSR y potencia inhibidora reforzada hacia actividades de endo y carboxidipeptidasa hNEP (al menos 10 veces más potencia inhibidora que el péptido nativo de opiorfina) (véase la Figura 10).

20 **Ejemplo 3: identificación de miméticos peptídicos bioactivos *in vitro* potentes de opiorfina que presentarían potencialmente propiedades de biodisponibilidad *in vivo* superiores al péptido nativo**

25 *1. Ganancia potencial en absorción biológica: transporte transmembrana (paso de membrana celular endoepitelial y epitelial)*

- [0137]** Modificaciones al péptido opiorfina por adición de restos hidrofóbicos químicos tales como espaciadores de polietileno C6, C8, C10 o C12 permitirían aumentar su potencia de absorción biológica *in vivo* hacia membranas. Entre todos los compuestos analizados, NH₂-QRF[S[O-octanoil]R]-COOH - NH₂-Y(PE12)QRFSR-COOH (PE= [CH₂]_n;
- 30 PE12=amino-ácido dodecanoico) mostraron ser inhibidores duales potentes de NEP humana (actividades específicas de endopeptidasa y carboxidipeptidasa) y actividades de AP-N.

2. Ganancia potencial en estabilidad metabólica: Dipéptido cistina: [CQRFSR]₂

- 35 **[0138]** El dipéptido [CQRFSR] presentó un aumento de al menos 2 veces de potencia inhibidora hacia actividades de endo y carboxidipeptidasa hNEP en comparación con el péptido monomérico CQRFSR. La secuencia dipeptídica debería permitir la protección del compuesto derivado contra degradación al circular aminopeptidasa.

REIVINDICACIONES

1. Un derivado peptídico de la fórmula (I):

5 ζ - AA₁-AA₂- AA₃-AA₄-AA₅-OH (I),

en la que:

- ζ es un átomo de hidrógeno, tirosina, Y-[enlazador]-, una cisteína, o C-[enlazador]-,

10

- AA₁ es Q o piroglutamato (Glp),

- AA₂ es R,

15 - AA₃ es F o F(X),

- AA₄ es S(O-alcanoilo),

- AA₅ es R,

20

- C-[enlazador]- significa Cis-[NH-(CH₂)_n-CO]-, en la que n es un entero entre 1 y 20,

- Y-[enlazador]- significa Tyr-[NH-(CH₂)_n-CO]-, en la que n' es un entero entre 1 y 20,

25 - F(X) significa una fenilalanina, cuyo grupo fenilo se sustituye por uno o más átomos de halógeno,

- S(O-alcanoilo) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo alcanoilo lineal o ramificado que tiene de 1 a 20 átomos de carbono,

30 - cualquier aminoácido de dicho péptido puede estar independientemente tanto en configuración L como en configuración D;

en el que, si el derivado peptídico comprende una cisteína, dicho derivado peptídico es opcionalmente un dímero.

35 2. Un derivado peptídico según la reivindicación 1, en el que ζ es un átomo de hidrógeno, cisteína, o C-[enlazador].

3. El derivado peptídico según la reivindicación 1, en el que ζ es un átomo de hidrógeno, tirosina o Y-[enlazador].

4. El derivado peptídico según la reivindicación 1 o 2, en el que

40

- ζ es un átomo de hidrógeno, cisteína, o C-[enlazador], y

- AA₁ es Q.

45 5. El derivado peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es QRFS(O-alcanoilo)R, C-[enlazador]-QRF-S(O-octanoil)-R o C-[NH-(CH₂)₆-CO]-QRF-S(O-alcanoil)R.

6. El derivado peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que S(O-alcanoil) es una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un octanoilo lineal o ramificado o un grupo dodecanoilo.

50

7. El derivado peptídico según la reivindicación 1, que es

QRF-S(O-octanoil)-R;

55 CQRF-S(O-octanoil)-R;

CQRF-S(O-dodecanoil)-R;

C-(-HN-(CH₂)₈-CO)-QRF-S(O-octanoil)-R;

60

C-[dQ]-RF-S(O-octanoil)-[dR];

[dC]-QRF-S(O-octanoil)-[dR];

65 C-(-HN-(CH₂)₈-CO)-QRF-S(O-octanoil)-R;

C(-HN-(CH₂)₁₂-CO-)QRF-S(O-octanoil)-R;

en el que:

- 5
- S(O-octanoil) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo octanoilo,
 - S(O-dodecanoilo) significa una serina, cuyo grupo hidroxilo se sustituye por un grupo dodecanoilo.
- 10 8. El derivado peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene potencia inhibidora contra endopeptidasa NEP y/o aminopeptidasa AP-N neutras.
9. El derivado peptídico según la reivindicación 3, que tiene potencia inhibidora contra NEP humana.
- 15 10. El derivado peptídico según la reivindicación 4, que es un inhibidor dual de endopeptidasa NEP y aminopeptidasa AP-N neutras.
11. Una composición que comprende al menos un derivado peptídico según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 12. Un derivado peptídico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para su uso en el tratamiento de enfermedades o trastornos en los que se busca una modulación de la actividad de una metalo-peptidasa de membrana.
- 25 13. El derivado peptídico para el uso según la reivindicación 12, en el que la metalo-ectopeptidasa de membrana es una metalopeptidasa de zinc de membrana.
14. El derivado peptídico para el uso según la reivindicación 12 o 13, en el que la metalo-ectopeptidasa de membrana es NEP y/o AP-N.
- 30 15. El derivado peptídico para el uso según cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno seleccionado de entre el grupo que consiste en dolor, trastornos depresivos, actividad social alterada ligada a la sexualidad y comportamiento sexual alterado.
- 35 16. Un anticuerpo dirigido contra un derivado peptídico tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

Efecto de peptidomiméticos en actividad de NEP-endopeptidasa

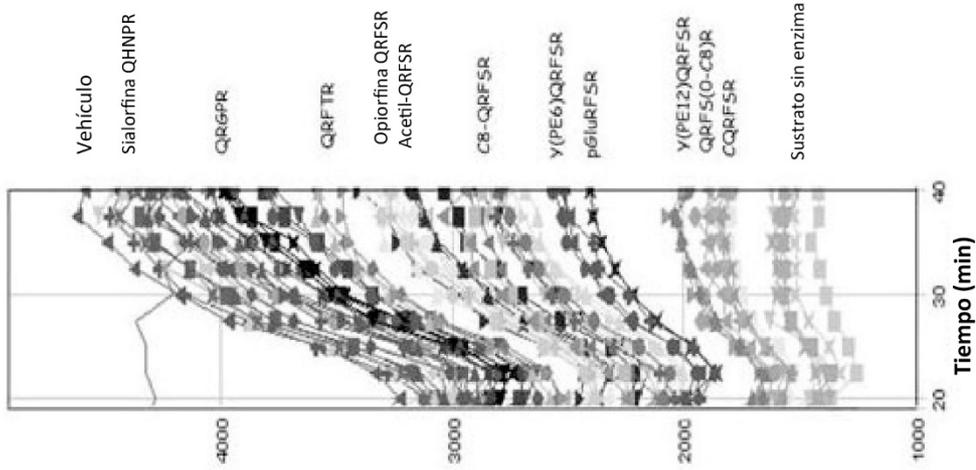


FIG.2

Efecto de peptidomiméticos en actividad de AP-N

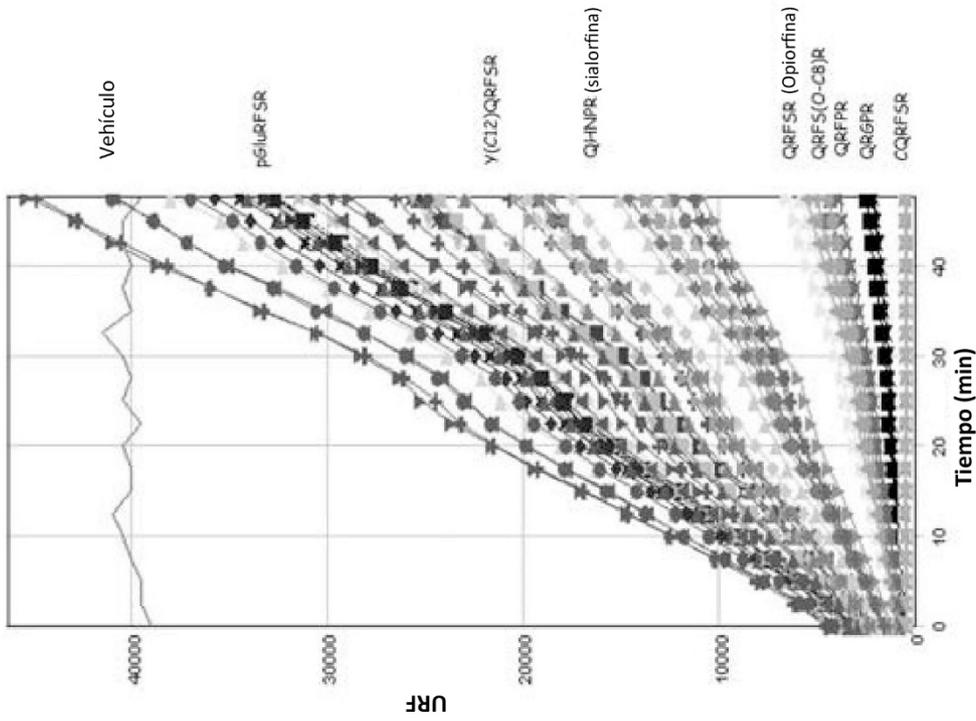


FIG.1

Efecto de peptidomimético en actividad de NEP-CDP2

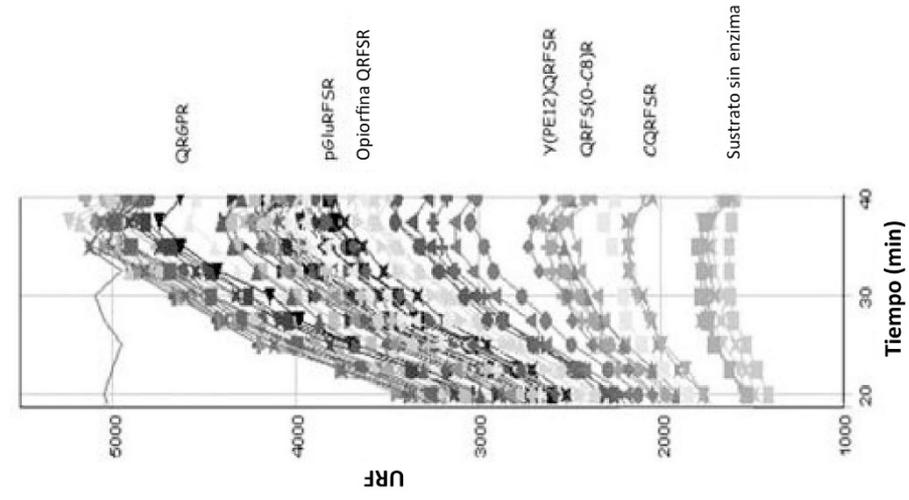


FIG.4

Efecto de peptidomiméticos en actividad de NEPCDP1

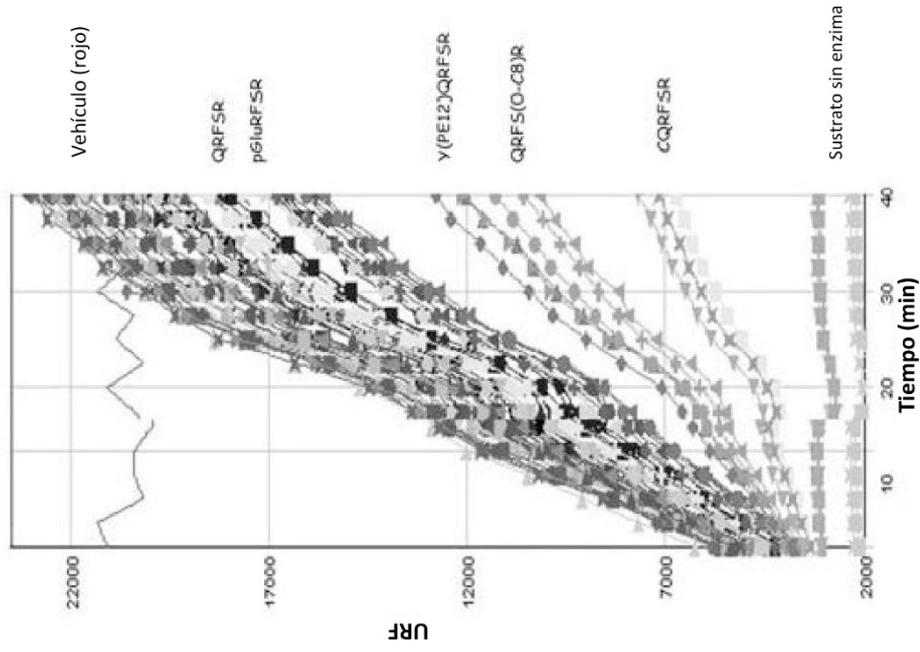


FIG.3

Inhibición de ectopeptidasas humanas inactivadoras de encefalina, %

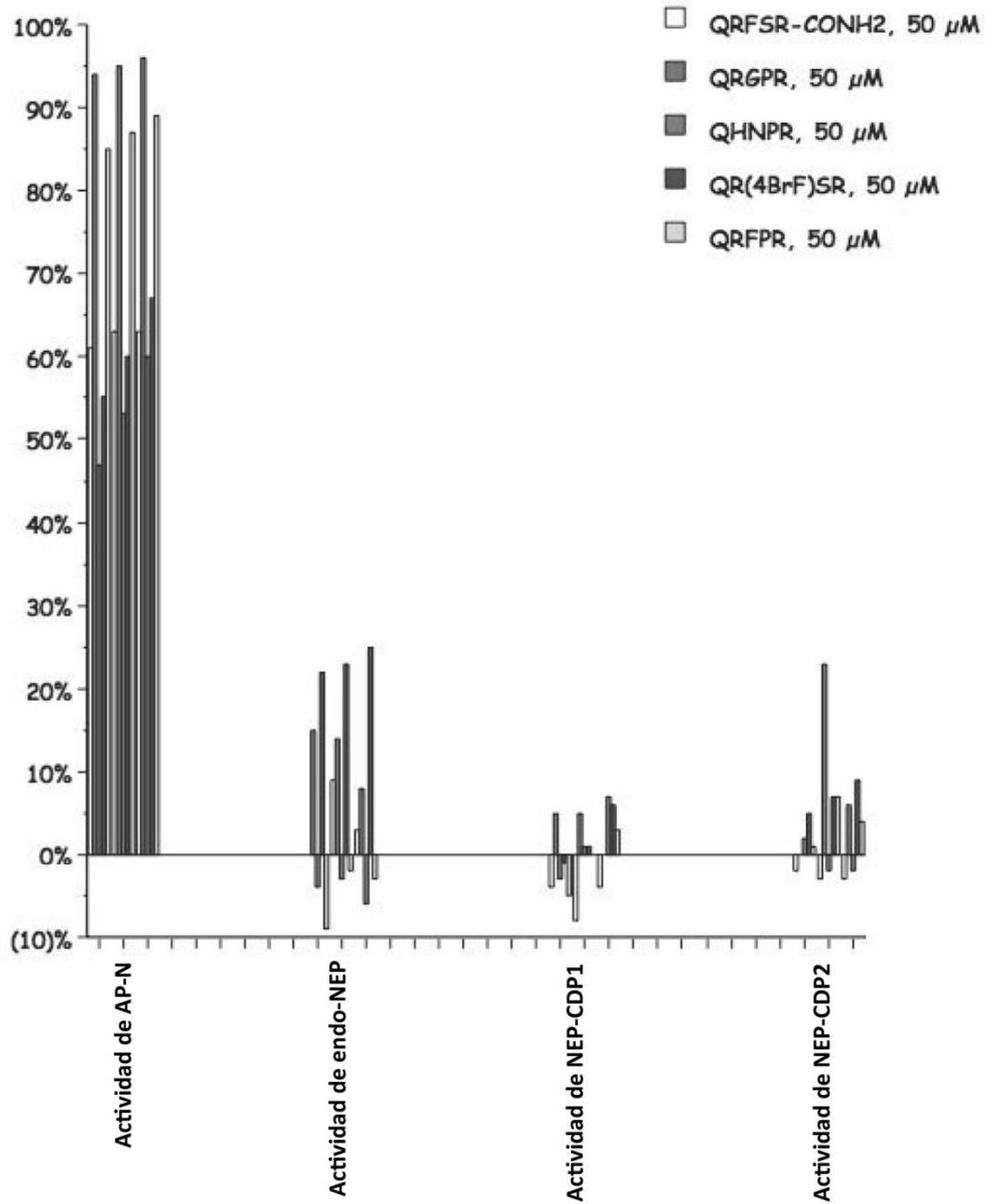


FIG.5

Inhibición de ectopeptidasas humanas inactivadoras de encefalina, %

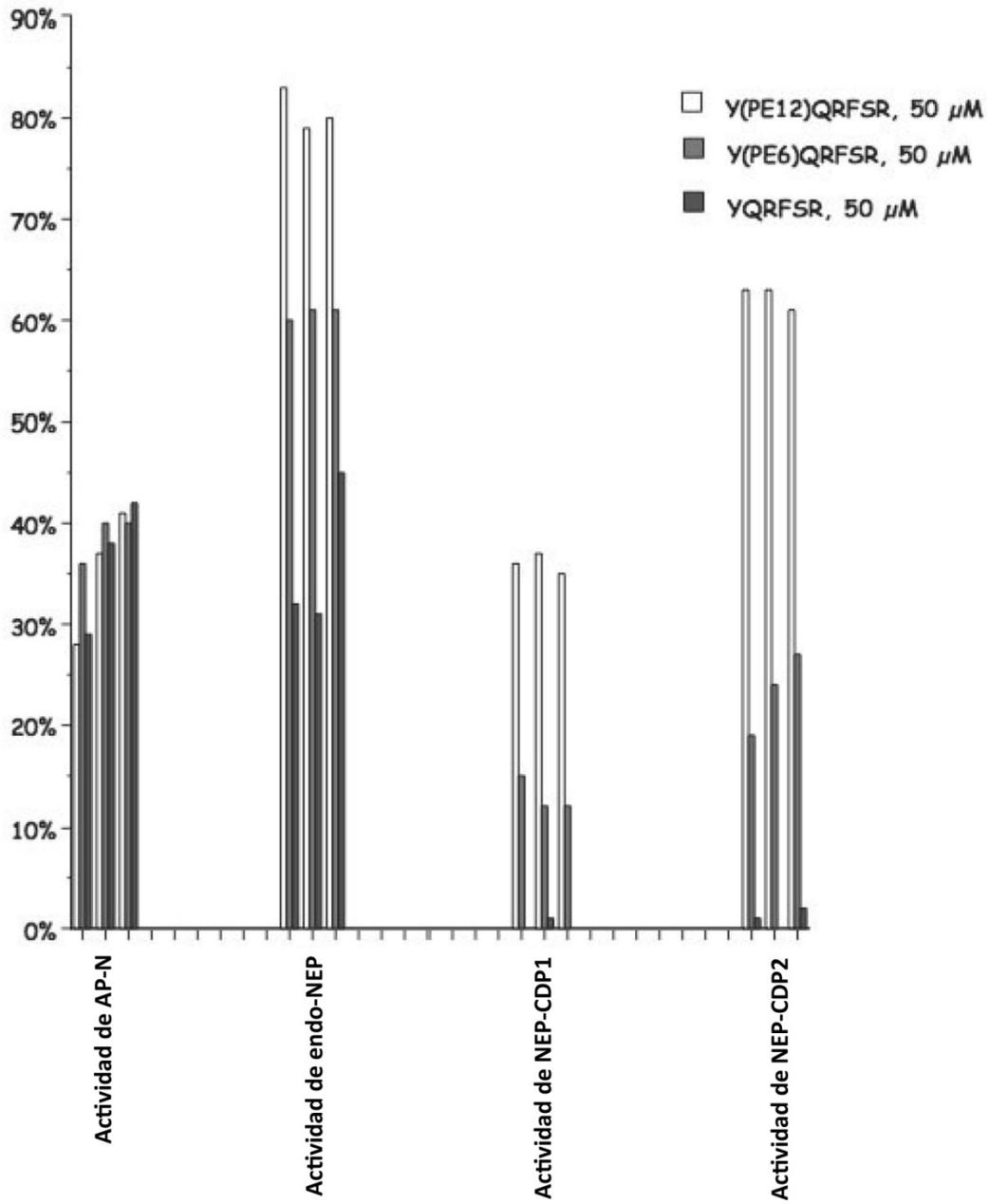


FIG.6

FIG.7

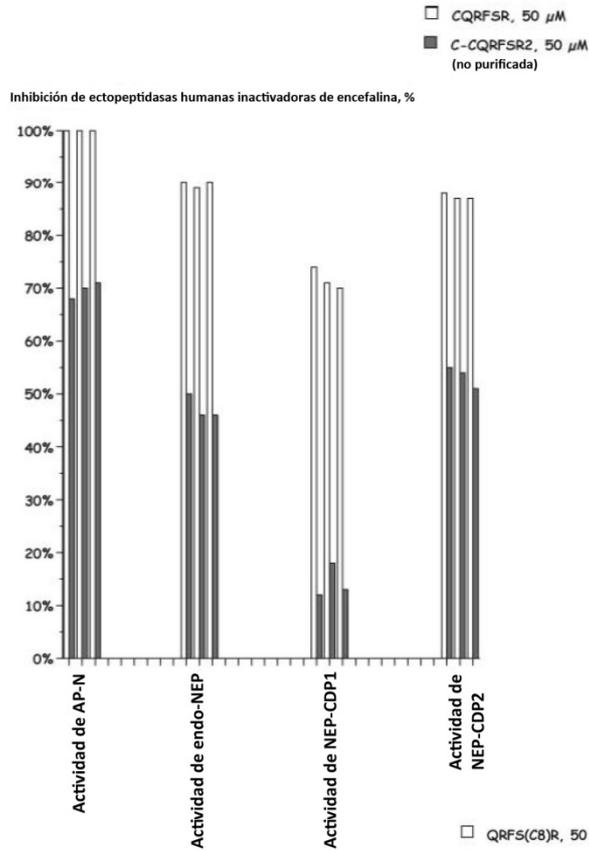
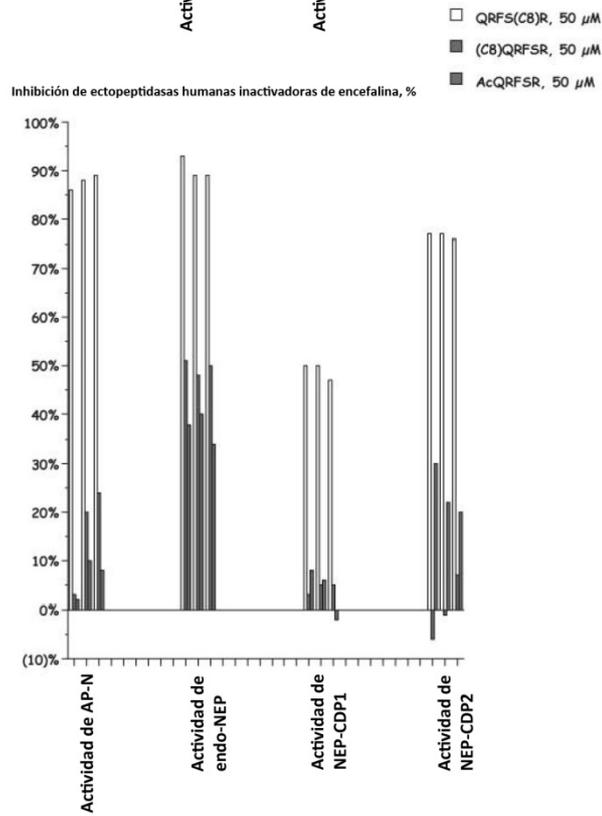


FIG.8



- ▼ CQRFSR (% Inh NEP CDP2)
- ◆ CQQRFSR (% Inh NEP endo)
- ▽ CQRFSR (% Inh NEP-McaBK)
- CQRFSR (%Inh APN)

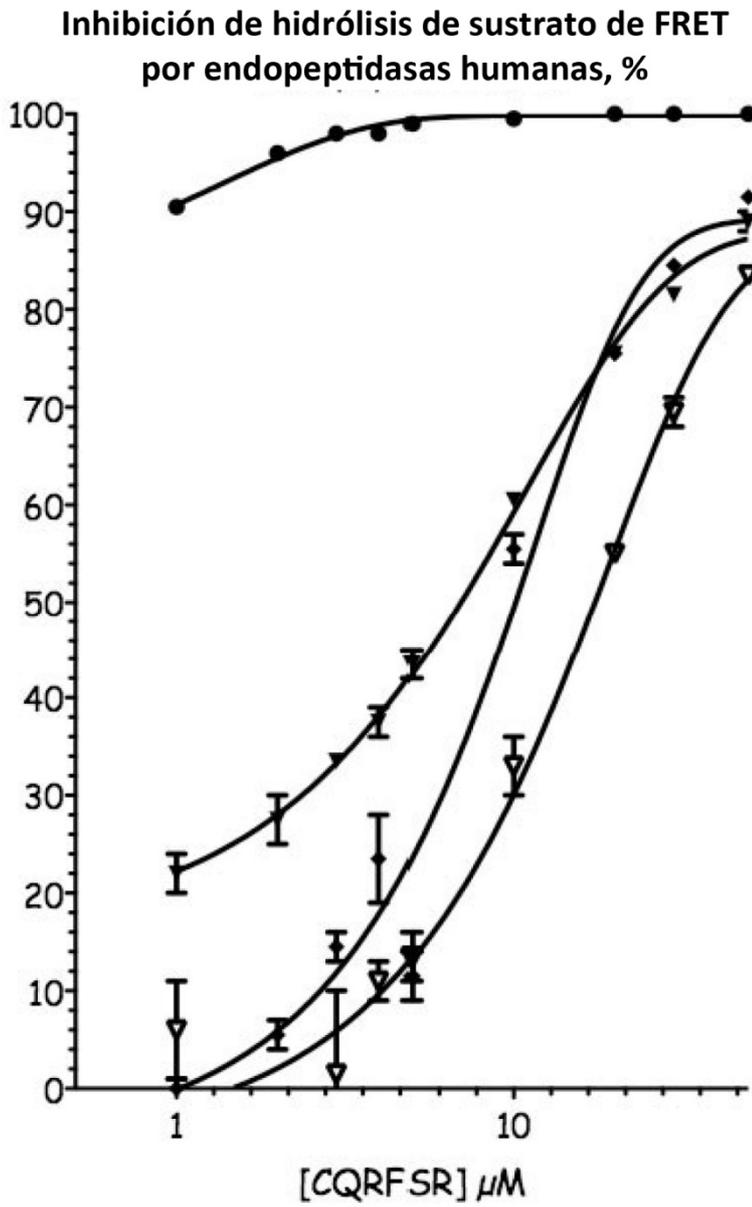


FIG.9

- ▼ QRFS(O-C8)R (% Inh NEP CDP2)
- ◆ QRFS(O-C8)R (% Inh NEP endo)
- ▽ QRFS(O-C8)R (% Inh NEP-McaBK)
- QRFS(O-C8)R (%Inh APN)

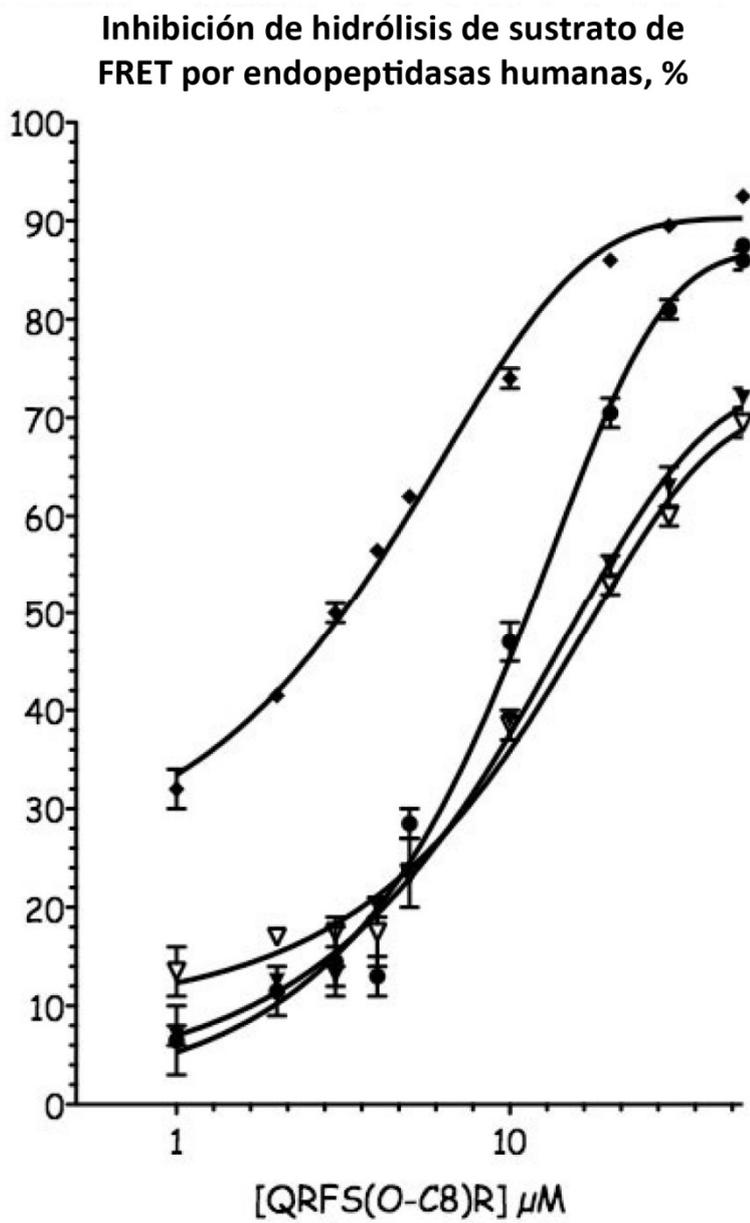
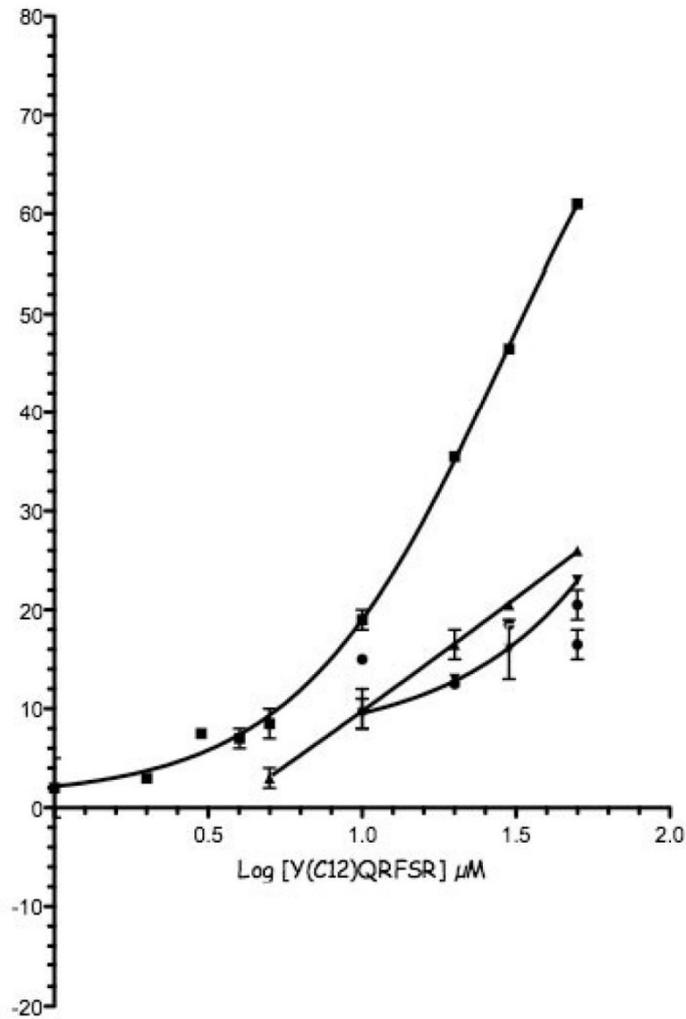


FIG.10

Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET por endopeptidasas humanas, %



- Y(C12)QRFSR (%Inh APN)
- ▲ Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-CDP2)
- Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-Endo)
- ▼ Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-McaBK2)

FIG.11

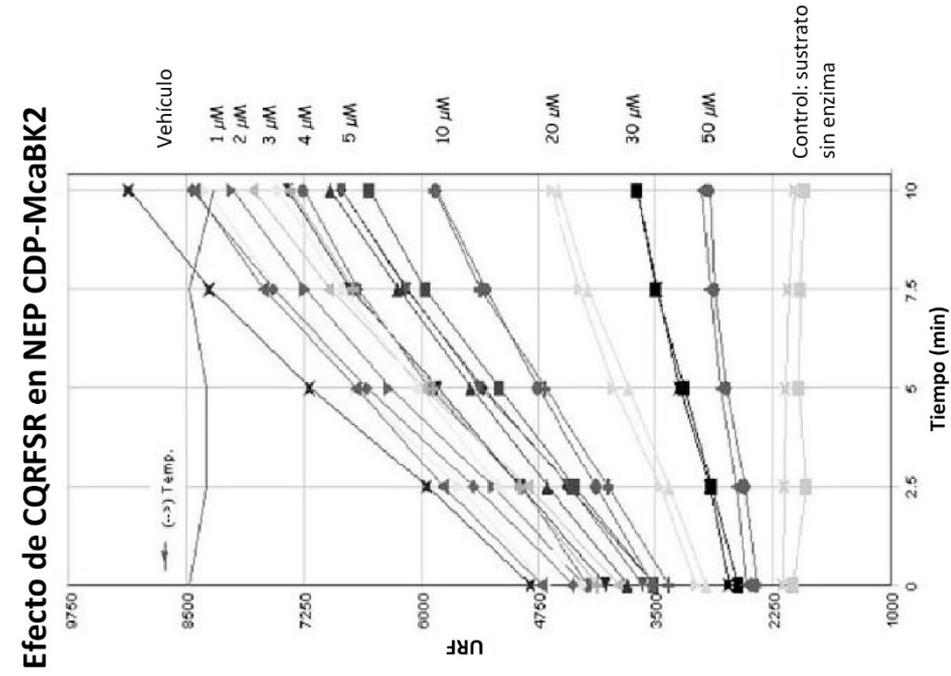


FIG.13

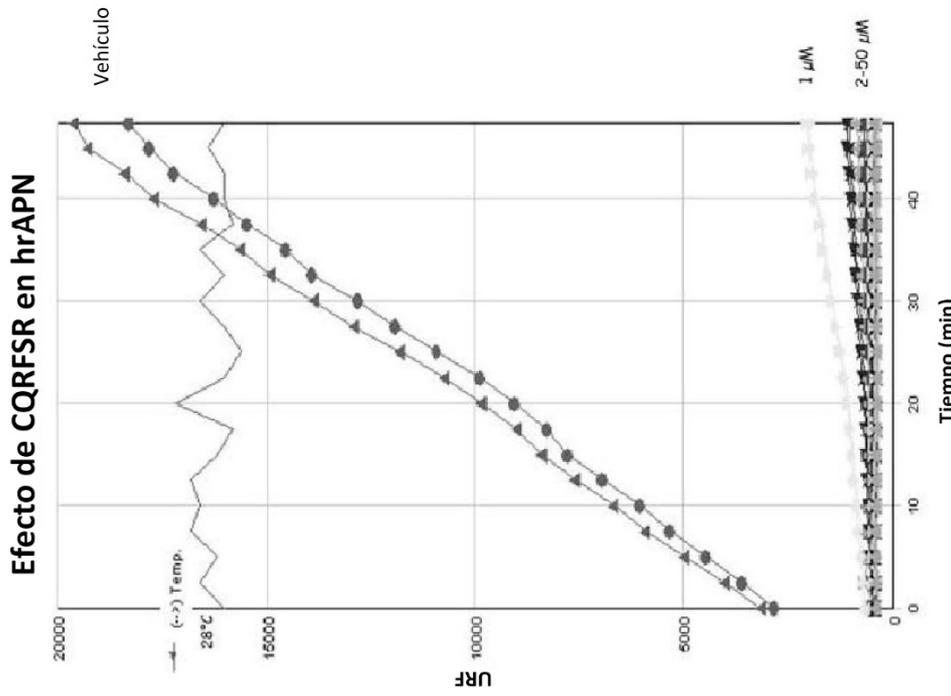


FIG.12

Efecto de CQRFSR en actividad específica de NEP-CDP

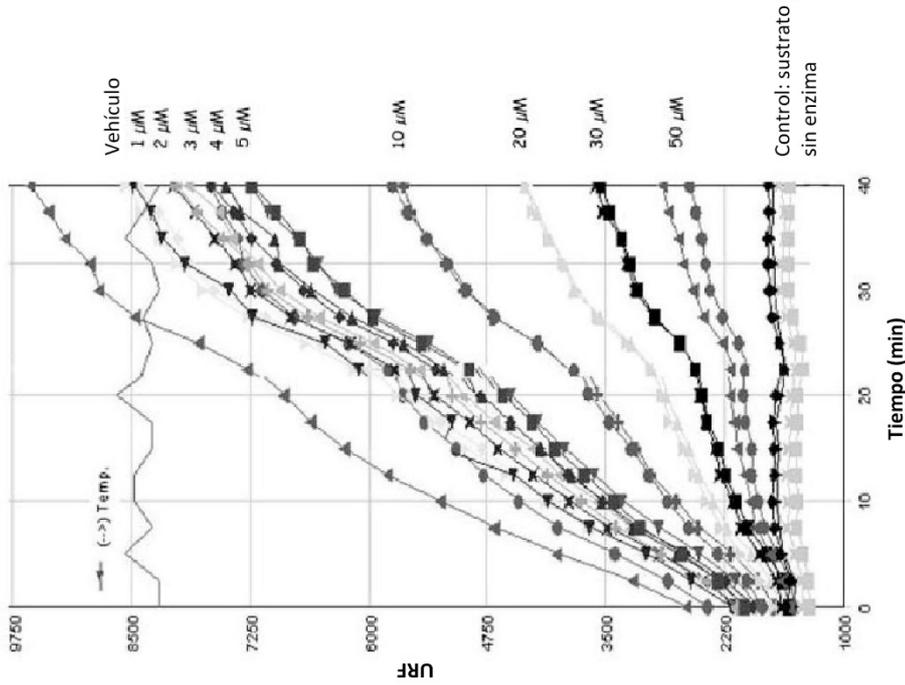


FIG.14

Efecto de CQRFSR en actividad endopeptidasa NEP

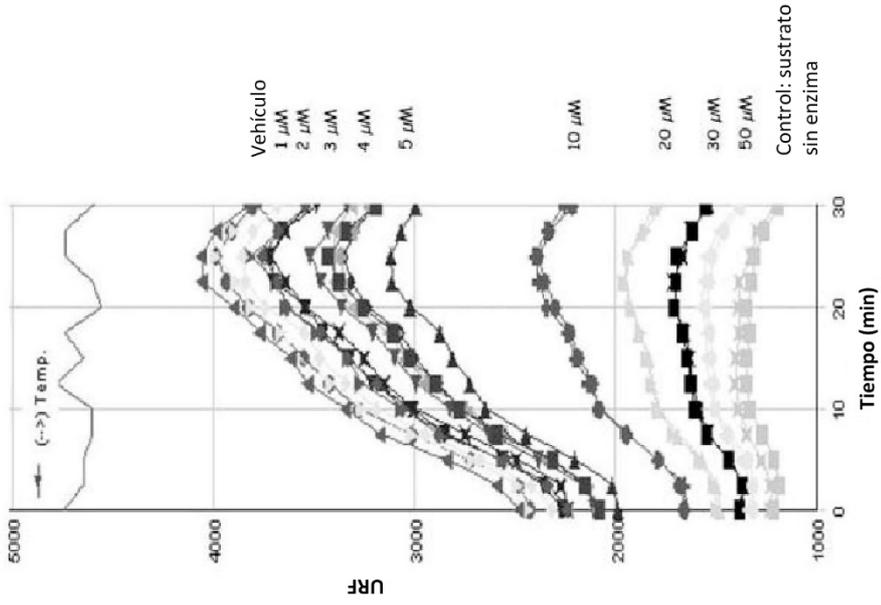


FIG.15

Efecto de QRFS(O-C8)R en actividad específica de NEP CDP

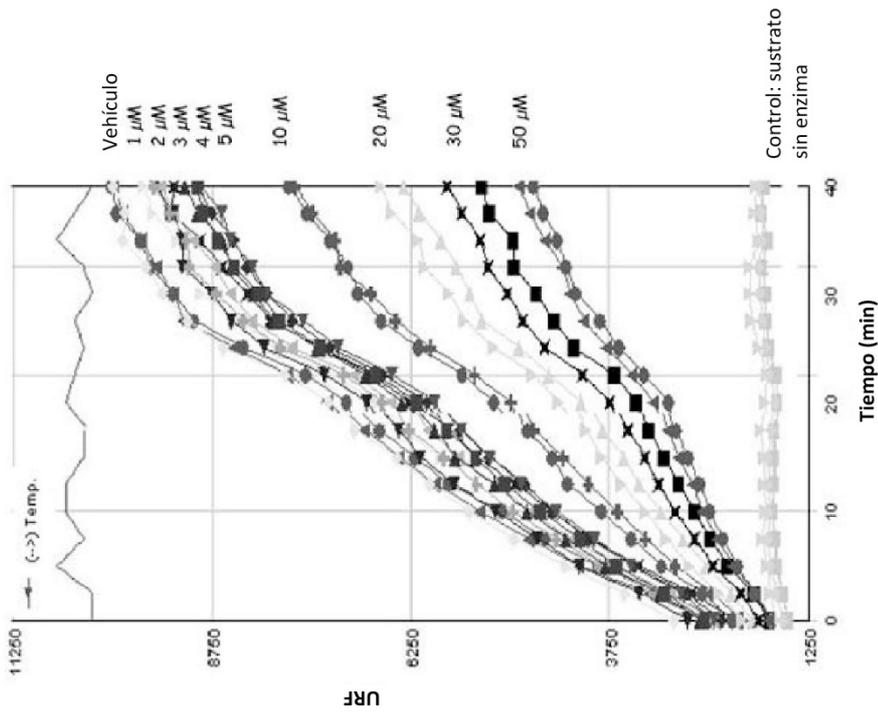


FIG.16

Efecto de QRFS(O-C8)R en endopeptidasa NEP

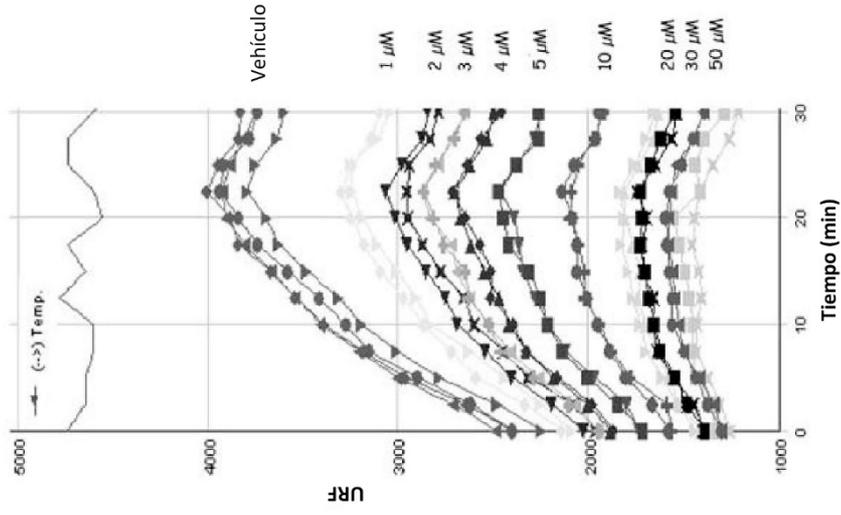


FIG.17

Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET por endopeptidasas humanas, %

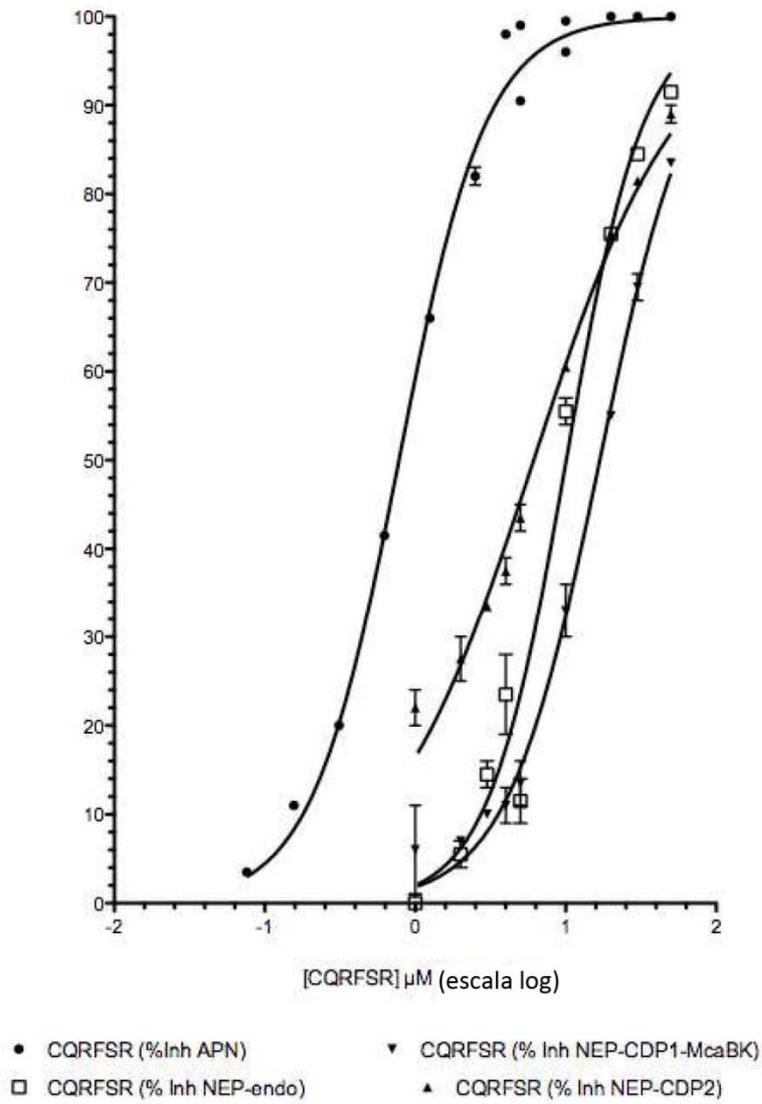
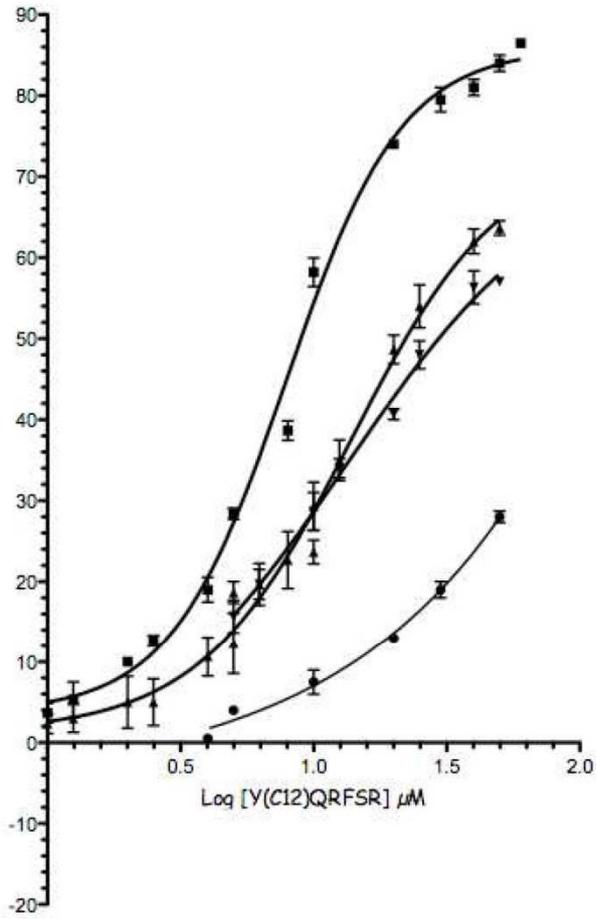


FIG.18

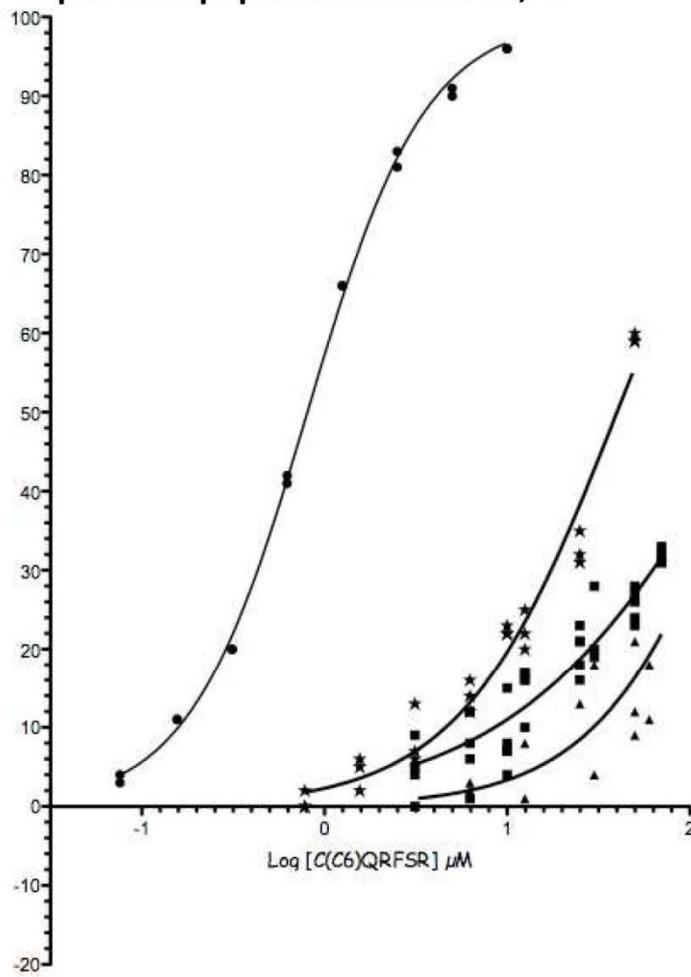
Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET por endopeptidasas humanas, %



- Y(C12)QRFSR (%Inh APN)
- Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-Endopeptidasa)
- ▲ Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-carboxipeptidasa1)
- ▼ Y(C12)QRFSR (% Inh NEP-carboxipeptidasa2)

FIG.19

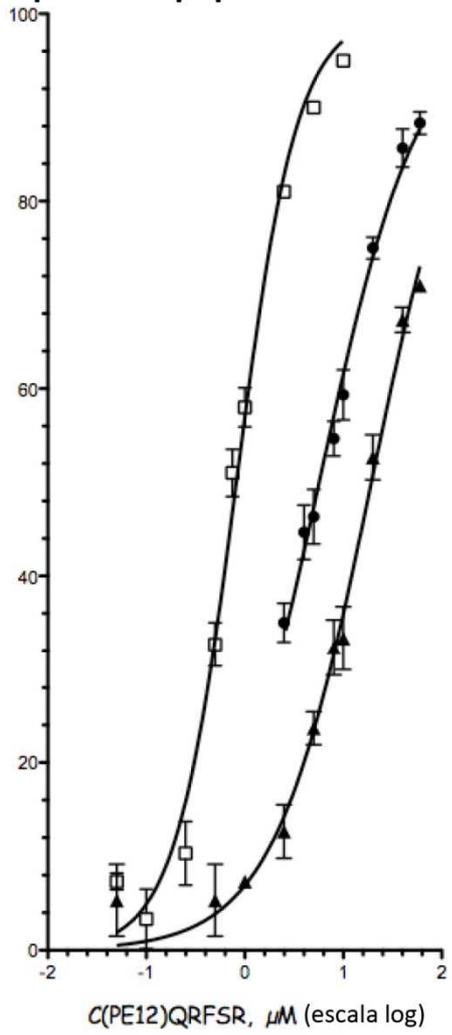
Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET por endopeptidasas humanas, %



- C(6)QRFSR (%Inh APN)
- ★ C(6)QRFSR (%Inh NEP-endo)
- C(6)QRFSR (%Inh NEP-CDP2)
- ▲ C(6)QRFSR (%Inh NEP-CDP1-Mca)

FIG.20

**Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET
por endopeptidasas humanas, %**

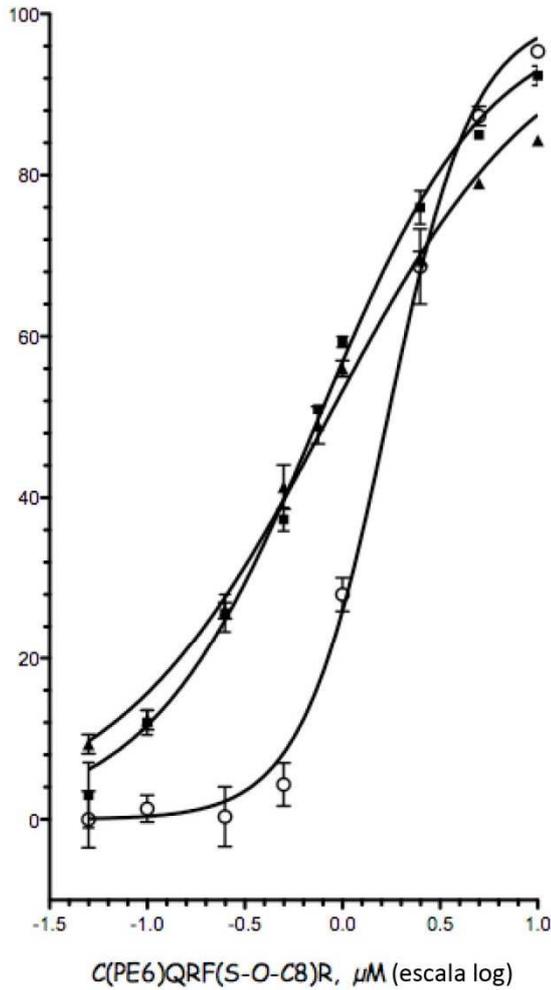


□ Inhibición de hAPN, %

▲ Inhibición de NEP1-CDP, % ● Inhibición de endopeptidasa NEP, %

FIG.21

**Inhibición de hidrólisis de sustrato de FRET
por endopeptidasas humanas, %**



○ Inhibición de hAPN, %

■ Inhibición de endopeptidasa NEP1, %

▲ Inhibición de NEP1-CDP, %

FIG.22

**Inhibición de hidrólisis de sustancia P por hNEP
de superficie celular expresada por células LNCaP
epiteliales humanas, %**

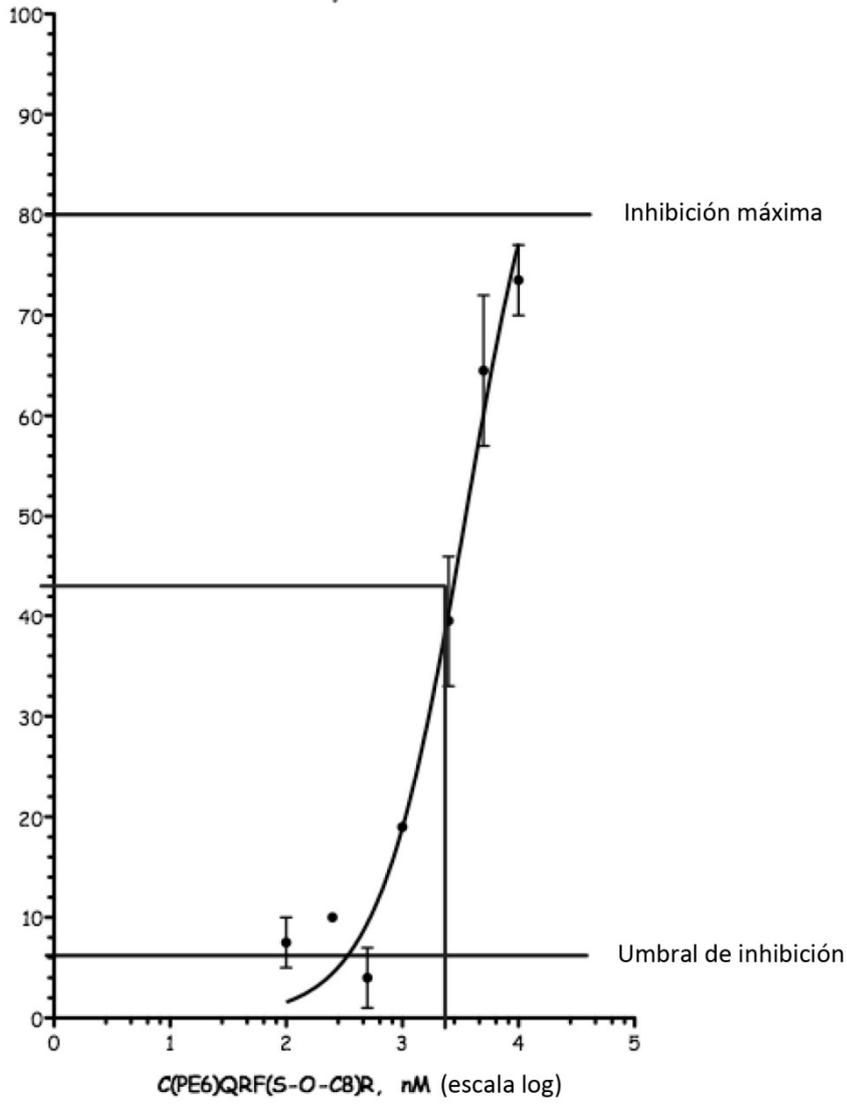


FIG.23