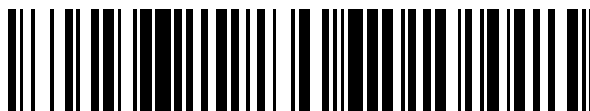


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 599**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

C07K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.08.2014** **PCT/GB2014/052514**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.02.2015** **WO15022549**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.08.2014** **E 14756109 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.11.2019** **EP 3033094**

54 Título: **Compuestos de unión a la MAP cinasa p38**

30 Prioridad:

15.08.2013 GB 201314610

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

20.05.2020

73 Titular/es:

BLUEBERRY THERAPEUTICS LIMITED (100.0%)
The Biohub, Alderley Park, Alderley Edge
Macclesfield, Cheshire SK10 4TG, GB

72 Inventor/es:

RIDDEN, JOHN

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 761 599 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

Compuestos de unión a la MAP cinasa p38

La presente invención se refiere a compuestos y sus usos. En particular, se refiere a péptidos y sus usos en la inhibición de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 alfa (nombre abreviado MAP cinasa p38 α) y en el tratamiento de afecciones inflamatorias.

Para evitar dudas, en general, el término MAP cinasa p38 α se usará en toda esta memoria descriptiva. Sin embargo, la enzima también se conoce por el siguiente nombre recomendado y términos: proteína cinasa activada por mitógeno 14 (nombres abreviados MAP cinasa 14 y MAPK 14) y la clasificación IUB EC 2.2.11.24. También tiene los nombres alternativos: proteína de unión a fármaco antiinflamatorio supresor de citocinas (nombre abreviado proteína de unión a CSAID y CSBP), MAP cinasa MXI2, proteína de interacción con MAX 2 y proteína cinasa 2a activada por estrés (nombre abreviado SAPK2a). La enzima también tiene el identificador de Uniprot Q16539. La enzima también se denomina algunas veces p38 α en la memoria descriptiva.

El listado o la discusión de un documento supuestamente previamente publicado en esta memoria descriptiva no se debe considerar necesariamente como una admisión de que el documento sea parte del estado de la técnica o sea conocimiento general común.

La MAP cinasa p38 α desempeña una función central en la inflamación y ha sido sujeto de amplios esfuerzos en tanto la investigación básica como el descubrimiento de fármacos. Schieven (2009) Curr. Top. Med. Chem. 9, 1038-1048 resume la biología de la cinasa p38 centrándose en su función en la inflamación. La cinasa p38 regula la producción de mediadores inflamatorios clave por células del sistema inmunitario innato, que incluyen TNFalfa, IL-1beta y COX-2. Además, p38 también actúa aguas abajo de citocinas tales como TNFalfa, mediando en algunos de sus efectos. Recientemente, también se ha encontrado que p38 desempeña una función en respuestas de linfocitos T, que incluyen Th17 y linfocitos T reguladores. De acuerdo con su función importante en la inflamación, pruebas evidentes sugieren que las células pueden utilizar una variedad de mecanismos de retroalimentación para regular y mantener la transducción de señales de p38. Los procesos biológicos regulados por la cinasa p38 sugieren tanto una amplia variedad de posibles indicaciones para inhibidores como un nivel de complejidad que ha demostrado ser exigente para los esfuerzos de descubrimiento de fármacos alrededor de esta diana.

Karcher & Laufer (2009) Curr. Top. Med. Chem. 9, 655-676 indica que desde 1993 se ha caracterizado un inmenso número de inhibidores de MAP cinasa p38. Aparte de los piridinilimidazoles bien conocidos, se han identificado múltiples armazones novedosos, pero solo un pequeño número ha avanzado hacia estudios de fase clínica II, probablemente debido a la alta toxicidad y mala selectividad. Según Karcher & Laufer, para obtener perfiles seguros de fármaco, se desearían alta potencia, interacción y toxicidad de CYP450 marginal (citocromo P450), así como altos niveles de selectividad.

Se conocen las estructuras cristalinas de MAP cinasa p38 α complejadas con los sitios de enlace sobre su sustrato nuclear MEF2A y activador MKK3b (Chang et al. (2002) Cell 9, 1241-1249).

Inhibidores previos de molécula pequeña han sufrido una falta de selectividad por la MAP cinasa p38 α y también de un intervalo de toxicidades en ensayos clínicos humanos, que incluyen una toxicidad hepática significativa. A conocimiento del inventor, ningún compuesto de MAP cinasa p38 α ha llegado satisfactoriamente al mercado, fracasando la mayoría en ensayos clínicos humanos de fase IIb.

La MAP cinasa p38 α desempeña una función central en la cascada de señalización de la inflamación y, por tanto, se cree que su inhibición tiene una función beneficiosa en una variedad de indicaciones humanas de enfermedad, especialmente afecciones inflamatorias. Estos incluyen, pero no se limitan a, trastornos inflamatorios de la piel tales como dermatitis atópica, psoriasis, acné vulgar, cicatrización dérmica. La activación de la MAP cinasa p38 α también puede desempeñar una función fundamental en otros trastornos que implican inflamación que incluyen enfermedad pulmonar obstructiva constrictiva, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, cáncer y artritis reumatoide.

La invención descrita en el presente documento proporciona compuestos que son útiles en la unión a e inhibición de la MAP cinasa p38 α , y son útiles como herramientas de investigación, en el descubrimiento de fármacos y en la medicina humana y veterinaria, particularmente para tratar afecciones inflamatorias. Dichas afecciones inflamatorias pueden existir en una variedad de mamíferos, que incluyen el hombre y perros. Ventajosamente, se proporcionan compuestos que son selectivos para la MAP cinasa p38 α y no se unen sustancialmente a, o inhiben, otras proteínas cinasas.

El documento de patente WO 2009/021137 se refiere a diversos péptidos inhibidores de cinasa. El documento de patente WO 2011/126882 se refiere a péptidos D3 antiinflamatorios.

La presente invención se define por las reivindicaciones. Se describe un compuesto que comprende la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRQ (SEQ ID NO: 1) o que comprende una parte de dicha secuencia de aminoácidos de 7 o más aminoácidos, o que comprende una variante de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha

parte de la misma en la que desde 1 hasta 5 aminoácidos han sido alterados, en donde el compuesto se une a la MAP cinasa p38 α .

Se usa el código de una letra de IUB/IUPAC para aminoácidos en toda la memoria descriptiva, a menos que se indique lo contrario, y la secuencia de aminoácidos se da en la dirección convencional de extremo N a C. Normalmente, los aminoácidos son L-aminoácidos, pero como se observa más adelante, algunos de ellos pueden ser D-aminoácidos. Los aminoácidos alterados en las variantes normalmente son aminoácidos que existen de forma natural, que incluyen los 20 aminoácidos que están codificados por el código genético, y también incluyen otros aminoácidos naturales tales como hidroxiprolina, selenometionina y carnitina. Sin embargo, uno o más de los aminoácidos alterados pueden ser aminoácidos no naturales tales como alilalanina y difenilalanina.

10 Normalmente, cuando un aminoácido de SEQ ID NO: 1 o una parte del mismo se altera, se cambia a un aminoácido conservativo. Por ejemplo, se considera que los aminoácidos dentro de los siguientes grupos de aminoácidos son alteraciones conservativas: (N, Q); (K, R); (S, T); (I, L, M); (F, Y). Así, convenientemente, un resto de aminoácido I se puede alterar a un resto de aminoácido L, o un resto de aminoácido N se puede alterar a un resto de aminoácido Q en el compuesto, y/o un resto de aminoácido K se puede alterar a un resto de aminoácido R en el compuesto, etc.

15 Los compuestos descritos pueden comprender 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1, o pueden comprender una variante de dichos 7 a 17, o los 18, aminoácidos contiguos de SEQ ID NO: 1 en los que desde 1 hasta 5 aminoácidos están alterados. Normalmente, se pueden alterar 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, o la parte de la misma desde 7 hasta 17 aminoácidos, presente en el compuesto. Se prefiere si la parte de los mismos contiene 15 aminoácidos contiguos o menos (tal como 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos), no más de cuatro aminoácidos están alterados (tales como tres, dos, uno o cero). También se prefiere que si la parte de los mismos contiene 10 aminoácidos contiguos o menos (tales como 9 o 10), no más de tres aminoácidos estén alterados (tales como dos, uno o cero). También se prefiere que si la parte de los mismos contiene siete u ocho aminoácidos contiguos, no más de dos aminoácidos estén alterados (tales como uno o cero). Se prefiere que no más de aproximadamente 25 % en número de los restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o de la parte de los mismos estén alterados. Se prefiere además que no más de aproximadamente 20 % o 15 % en número de los restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o de la parte de los mismos estén alterados. El % se puede calcular determinando el número de restos de aminoácidos alterados en comparación con SEQ ID NO: 1 o la parte apropiada de los mismos, dividiendo entre el número de restos de aminoácidos en la parte correspondiente a SEQ ID NO: 1 y multiplicando por 100. Por ejemplo, el péptido
30 **HALA**IFQKIMW tiene dos restos amino (subrayados, negrita) que se diferencian de la parte de SEQ ID NO: 1 con la que se puede preparar, concretamente RALLIFQKIMW. Así, el % de restos alterados se calcula como $2/11 \times 100 \% = 18,2\%$.

Preferentemente, el compuesto descrito comprende la secuencia de aminoácidos RXXXXFQ, en donde X es cualquier aminoácido. Más preferentemente, el compuesto descrito comprende la secuencia de aminoácidos
35 RALLIFQ. Todavía más preferentemente, el compuesto descrito comprende la secuencia de aminoácidos RALLIFQKIM.

El compuesto se puede representar como X₁-X₂-X₃-X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄-X₁₅-X₁₆-X₁₇-X₁₈. Preferentemente, X₄ puede ser R, K, Q o H, X₉ puede ser F, Y o H, X₁₀ puede ser Q, N, K o R. Preferentemente, el compuesto es uno en el que X₄ es R, X₉ es F o X₁₀ es Q. Más preferentemente, el compuesto es uno en el que X₄ es R, X₉ es F y X₁₀ es Q.
40

Se prefiere que al menos 3 de los siguientes ocurran en el compuesto: X₁ es H, X₂ es K, X₃ es S, X₅ es A, X₆ es L, X₇ es L, X₈ es I, X₁₁ es K, X₁₂ es I, X₁₃ es M, X₁₄ es W, X₁₅ es L, X₁₆ es R, X₁₇ es R, y X₁₈ es Q. Se prefiere si al menos 4 o 5 o 6 o 7 u 8 o 9 o 10 o 11 o 12 o 13 o 14 de las posiciones inmediatamente precedentes de aminoácidos ocurren en el compuesto.

45 Se prefiere particularmente si el compuesto es uno en donde X₂ es K, X₈ es I, X₁₃ es M o X₁₆ es R. Se prefiere particularmente si el compuesto es uno en donde X₂ es K, X₈ es I, X₁₃ es M y X₁₆ es R.

Los compuestos también incluyen aquellos en los que X₁ es A, V, I o L, X₂ es A, R, I o L, X₃ es A, V, S, T, N o Q, X₄ es R, K, Q o H, X₅ es A, V, I o L, X₆ es L, I, A o V, X₇ es A, V, I o L, X₈ es A, V, I o L, X₉ es F, Y o H, X₁₀ es Q, N, K o R, X₁₁ es K, Q o R, X₁₂ es I, L, V o A, X₁₃ es M, L, I, C, X₁₄ es W, A, V, I, L, M o F, X₁₅ es L, I, A o V, X₁₆ es A, V, I, L, R, K, Q o H, X₁₇ es A, V, I o L, y/o X₁₈ es Q, A, V, I o L.
50

También se apreciará que cuando el compuesto comprende menos de 18 restos de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, cierta posición X puede ser "nula" (es decir, no contiene un resto de aminoácido). Así, por ejemplo, cuando el compuesto comprende una parte de SEQ ID NO: 1 de 17 restos de aminoácidos contiguos, o X₁ es nulo o X₁₈ es nulo. Similarmente, cuando el compuesto comprende una parte de SEQ ID NO: 1 de 16 restos de aminoácidos contiguos, X₁ y X₂, o X₁ y X₁₈ o X₁₇ y X₁₈ son nulos, etc., para partes de SEQ ID NO: 1 de restos de aminoácidos contiguos.
55

Se prefiere que la secuencia de aminoácidos del compuesto descrito tenga desde 7 hasta 18 aminoácidos. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede tener 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 o 17 aminoácidos. Se prefiere si el

compuesto tiene desde 8 hasta 18 aminoácidos. También se prefiere si el compuesto tiene desde 11 hasta 18 aminoácidos. Normalmente, cuando el compuesto consiste en un péptido, tiene un peso molecular inferior a 30.000 dáltones, preferentemente inferior a 25.000 dáltones, más preferentemente inferior a 20.000 dáltones. Normalmente, cuando el compuesto comprende una porción de péptido unida a otro resto como se trata más adelante, el compuesto puede tener normalmente un peso molecular de entre 10.000 dáltones y 100.000 dáltones, tal como entre 20.000 dáltones y 80.000 dáltones, por ejemplo entre 20.000 dáltones y 50.000 dáltones.

Los compuestos descritos incluyen los que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos (R, K, Q, H) A L (L, A, V, I, L) I (F, Y, H) (Q, N, K, R) K I M (W, A, V, I, L) en donde un aminoácido de cada conjunto entre paréntesis se usa en esa posición y en donde el compuesto se une a la MAP cinasa p38α. Así, se describen compuestos que comprenden la secuencia de aminoácidos X₄-X₅-X₆-X₇-X₈-X₉-X₁₀-X₁₁-X₁₂-X₁₃-X₁₄ en donde X₄ es R, K, Q o H, X₅ es A, X₆ es L, X₇ es L, A, V, I o L, X₈ es I, X₉ es F, Y o H, X₁₀ es Q, N, K o R, X₁₁ es K, X₁₂ es I, X₁₃ es M y X₁₄ es W, A, V, I o L en donde el compuesto se une a la MAP cinasa p38α. En dichos compuestos, cada uno de X₁, X₂, X₃, X₁₅, X₁₆, X₁₇ y X₁₈ son "nulos" (es decir, ningún resto de aminoácido presente en esa posición).

Los compuestos incluyen HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1), HKSRALLIFQKIMWLRR (SEQ ID NO: 2), HKSRALLIFQKIMWLR (SEQ ID NO: 3), HKSRALLIFQKIMWL (SEQ ID NO: 4), HKSRALLIFQKIMW (SEQ ID NO: 5), KSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 6), SRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 7), SRALLIFQKIM (SEQ ID NO: 8), SRALLIFQ (SEQ ID NO: 9), HALAIFQKIMW (SEQ ID NO: 10), HKSRALAIFQKIMALRRQ (SEQ ID NO: 11), AKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 12), HKSRALAIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 13), HKSRALLIFQKIMWARRQ (SEQ ID NO: 14), HKSRALLIFQKIMWLRAQ (SEQ ID NO: 15), HKSRALLIFQKIMWLRRRA (SEQ ID NO: 16) y SRALLIFQKI (SEQ ID NO: 17)

Las secuencias de aminoácidos de los compuestos son péptidos, por cuyo término los presentes inventores incluyen compuestos que tienen restos de aminoácidos (H-Cα-[cadena lateral]), pero que se pueden unir por enlaces peptídicos (-CO-NH-) o no peptídicos como se trata a continuación.

Se pueden sintetizar péptidos por el modo de Fmoc-poliámidas de síntesis en fase sólida de péptidos como se desvela por Lu et al. (1981) J. Org. Chem. 46, 3433, incorporado en el presente documento como referencia, y referencias en su interior. Los reactivos para la síntesis de péptidos están fácilmente comercialmente disponibles.

La purificación de los compuestos se puede efectuar por una cualquiera, o una combinación de, técnicas tales como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico y (principalmente) cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. El análisis de péptidos se puede llevar a cabo usando cromatografía en capa fina, cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa, análisis de aminoácidos después de la hidrólisis ácida y por análisis de espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos (FAB).

Un compuesto preferido consiste en la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) o una parte de dicha secuencia de aminoácidos de 7 o más aminoácidos o que comprende una variante de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha parte de la misma en la que desde 1 hasta 5 aminoácidos han sido alterados, en donde el compuesto se une a la MAP cinasa p38α. Las preferencias adicionales son las mismas que antes. Como se trata más adelante, se prefiere si los compuestos están N-acetilados; se prefiere particularmente que el compuesto que consiste en la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) esté N-acetilado. Al compuesto que consiste en la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) y que está N-acetilado se le ha dado el nombre de código BB2702 cuando todos los aminoácidos son L-aminoácidos y existen enlaces peptídicos entre todos los restos de aminoácidos.

El compuesto puede contener al menos un resto de D-aminoácido, tal como 1, 2 o 3 o 4 o 5 o 6 o 7 o 8 D-aminoácidos. Normalmente, el compuesto contiene 0, 1, 2 o 3 D-aminoácidos. La presencia de D-aminoácidos en el compuesto puede ser útil en prevenir la degradación del compuesto por proteasas. Otros métodos para hacer los péptidos resistentes a la degradación proteolítica incluyen el bloqueo de los restos de aminoácidos de los extremos N y/o C. Así, se bloquean los restos de aminoácidos de los extremos N y/o C. Los métodos de bloqueo adecuados incluyen acetilación del extremo N o incorporación de un resto de piroglutamato en el extremo N.

Existen varios enfoques diferentes para el diseño y la síntesis de compuestos de péptido que no contienen enlaces amida. En un enfoque, tal como se desvela por Sherman & Spatola (1990) J. Am. Chem. Soc. 112, 433, incorporado en el presente documento como referencia, se han sustituido uno o más enlaces amida en un modo esencialmente isostérico por una variedad de grupos funcionales químicos.

Se pueden sintetizar retro-inverso-peptidomiméticos, en los que se invierten los enlaces peptídicos, por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, tales como los descritos en Mézière et al. (1997) J. Immunol. 159 3230-3237, incorporado en el presente documento como referencia. Este enfoque implica preparar pseudopéptidos que contienen cambios que implican al esqueleto, y no la orientación de cadenas laterales. Los péptidos retro-inversos, que contienen enlaces NH-CO en lugar de enlaces peptídicos CO-NH, son más resistentes a la proteólisis.

Puede ser ventajoso introducir un resto cíclico en una región estructural basada en péptido. El resto cíclico restringe el espacio conformacional de la estructura de péptido y esto puede conducir a un aumento de la afinidad del péptido

por la MAP cinasa p38 α . Una ventaja añadida de esta estrategia es que la introducción de un resto cíclico en un péptido también puede dar como resultado que el péptido tenga una sensibilidad reducida a peptidasas celulares.

Aunque se prefiere si el compuesto es un péptido como se define, el compuesto puede consistir en un péptido unido a otro resto. Los restos convenientes a los que se puede unir el péptido incluyen polietilenglicol (PEG) y secuencias de péptidos, tales como TAT y antenapiedios que potencian la administración a células.

La PEGilación es un método bien conocido para los expertos en la técnica en donde un (péptido u otro compuesto) se modifica de forma que una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) se unan covalentemente a la cadena lateral de uno o más aminoácidos. Es una de las técnicas de química estructural de alteración de moléculas (MASC) más importantes. Se pueden usar otras técnicas de MASC; dichas técnicas pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de un compuesto, por ejemplo, prolongar su semivida en suero *in vivo*. Se forma un conjugado PEG-péptido activando primero el resto de PEG de manera que reaccione con, y se acople a, el compuesto descrito. Los restos de PEG varían considerablemente en peso molecular y conformación, siendo los restos tempranos (PEGs monofuncionales; mPEGs) lineales con pesos moleculares de 12 kDa o menos, y siendo los posteriores de pesos moleculares elevados. PEG2, una innovación reciente en la tecnología de PEG, implica el acoplamiento de un mPEG de 30 kDa (o menos) a un aminoácido de lisina (aunque la PEGilación se puede prolongar a la adición de PEG a otros aminoácidos) que reacciona adicionalmente para formar una estructura ramificada que se comporta como un mPEG lineal de peso molecular mucho mayor (Kozlowski et al., (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429). Los métodos que se pueden usar para unir covalentemente las moléculas de PEG a los compuestos se describen además en Roberts et al. (2002) *Adv Drug Deliv Rev* 54, 459 - 476, Bhadra et al., (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29, Kozlowski et al., (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224, y Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417, todos incorporados en el presente documento como referencia.

Las posibles ventajas de PEGilación del compuesto incluyen eliminación renal reducida que, para algunos productos, da como resultado una adsorción más sostenida después de la administración subcutánea, así como distribución restringida, que posiblemente conduce a concentraciones plasmáticas más constantes y sostenidas y, por tanto, al aumento en la eficacia clínica. Las posibles ventajas adicionales incluyen inmunogenicidad reducida del compuesto terapéutico, y menor toxicidad.

El compuesto es uno que es capaz de unirse a la MAP cinasa p38 α . La MAP cinasa p38 α es la enzima humana cuya secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 18) se da en la Figura 1. Convenientemente, la enzima se puede fusionar con una secuencia de polipéptidos, tal como una GST, que permite su inmovilización sobre un sustrato sólido.

Cuando el compuesto es un péptido, una forma adecuada de determinar la unión a la MAP cinasa p38 α es usar técnicas de presentación en fagos. El ADN que codifica la conducción de péptidos se puede clonar en el vector de fagémido M13 gpIII, transformar en células de *E. coli* TG1 y sembrar en placas de 2 % de glucosa, 2xTY, 100 μ g/mL de ampicilina. Las colonias se cultivan para la producción de partículas de fago como se describe (Scott & Smith (1990) *Science* 249, 386-390). Para el ensayo, se recubre 1 μ g de MAP cinasa p38 α sobre placas de poliestireno Mejeorp™ (marca Nunc™, Fisher Scientific, Loughborough, R. U.) en 100 μ l de PBS durante 1 hora a temperatura ambiente y luego se lavan una vez con PBS seguido por bloqueo con 2 % de BSA en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añaden 100 μ l de sobrenadante de fago por pocillo y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente. Se lavan las placas cuatro veces con PBS/Tween20 y dos veces con PBS. Se diluye el anticuerpo secundario anti-M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) (GE Healthcare U.K. Ltd., Chalfont St. Giles, R. U.) 1:5000 en 2 % de BSA en PBS y se incuba durante una hora a temperatura ambiente seguido por lavado como antes. Los ensayos de ELISA se realizan como se describe (McGregor & Robins (2001) *Anal. Biochem.* 294, 108-117. El ensayo se desarrolló con sustrato de peroxidasa SureBlue TMB (Insight Biotechnology, Middlesex, R. U.) y se leyó a 450 nm. Los péptidos que se unieron a la MAP cinasa p38 α se prueban para especificidad contra la MAP cinasa p38 α biotinilada y estreptavidina y luego contra β -galactosidasa, BclX, anticuerpo anti-FLAG M2, albúmina de huevo y lisozima, todos recubiertos a 0,5 μ g en una placa recubierta con estreptavidina (StreptaWell; Roche Diagnostics Ltd., Burgess Hill, R. U.) usando las mismas condiciones de ELISA como se ha descrito anteriormente. Este método se puede usar para establecer la unión de péptido específica directa a MAP cinasa p38 α , y la unión se indica por un aumento de la señal colorimétrica con respecto al fondo de control.

Se prefiere particularmente si el compuesto es uno que compite para unirse a la MAP cinasa p38 α de un péptido con SEQ ID NO: 1 (todos los L-aminoácidos y que contienen enlaces peptídicos entre los restos de aminoácidos, estando el péptido N-acetilado, es decir, BB2702). Si un compuesto es uno que puede o no competir para unirse a la MAP cinasa p38 α de un péptido con SEQ ID NO: 1, se puede determinar como sigue.

El péptido N-acetilado HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) (es decir, BB2702) se marca fluorescentemente (es decir, con un fluoróforo) y se une a la MAP cinasa p38 α . El desplazamiento de este péptido por un compuesto es indicativo de la unión de ese compuesto a MAP cinasa p38 α , y se puede medir por polarización por fluorescencia. La polarización por fluorescencia es una técnica empírica de detección de fluorescencia que mide los componentes verticales y horizontales de la emisión de fluorescencia creada usando excitación polarizada plana. Los valores de polarización (medidos en unidades de mP) para cualquier complejo marcado con fluoróforo están inversamente relacionados con la velocidad de rotación molecular de ese complejo. Puesto que la rotación molecular está, a su

vez, inversamente relacionada con su volumen molecular, el péptido marcado con fluorescencia poseerá un mayor valor de polarización cuando interacciona con cualquier molécula lo suficiente larga como para ralentizar su velocidad de rotación molecular (la MAP cinasa p38 α en este caso). Así, la magnitud de la señal de polarización se usa para determinar cuantitativamente el grado de unión de péptido marcado con fluorescencia sin la necesidad de cualquier etapa de separación por filtración o lavado. El principio de este ensayo de unión por desplazamiento es la competición entre el péptido fluorescentemente marcado y el compuesto sin marcar para unirse al sitio de unión de la MAP cinasa p38 α , usando un método de detección de polarización de fluorescencia. La unión de compuesto sin marcar provoca el desplazamiento del péptido fluorescentemente marcado y una pérdida de señal de mP. Cualquier pérdida de señal indica desplazamiento. Una gran pérdida de señal indica mayor desplazamiento que una pequeña pérdida de señal que indica menor desplazamiento. Se puede usar cualquier número de lectores de polarización fluorescentes para medir el desplazamiento.

Es aún más preferido si el compuesto es uno que inhibe la MAP cinasa p38 α . La inhibición de la MAP cinasa p38 α se puede determinar como sigue. La proteína básica de mielina (MBP) es un sustrato de la MAP cinasa p38 α y se fosforila en presencia de esta enzima y ATP. El evento de fosforilación se puede monitorizar usando anticuerpos que reconocen el resto fosforilado de serina o treonina, o midiendo la incorporación de fosfato radiactivamente marcado en la proteína. La inhibición se mide por una disminución en la fosforilación de MBP. BB2702 inhibe la MAP cinasa p38 α directamente e inhibe la activación de la MAP cinasa p38 α . Esto se puede observar considerando la actividad de BB2702 contra la MAP cinasa p38 α fosforilada y no fosforilada (véase la Tabla 3 en el Ejemplo 9 a continuación). El compuesto puede inhibir la activación de la MAP cinasa p38 α por MKK6.

Se prefiere particularmente si el compuesto es uno que se une a e inhibe la MAP cinasa p38 α , pero no se une sustancialmente a e inhibe cualquiera de Jnnk, PKCd, p38b, AMPK, AurA, GK3b, RAF1, JNK3, VEGF, p38g, PKCb, PKCa, PDHK2, PDK1, MKK6, p27 KIP, Cdk2 KIP, Prak KIP, Chk1 KIP, Egfr KIP, Kdr KIP, EGF KIP, Zap 70 KIP, IGFR KIP, Src KIP, Fak KIP, Jak3 KIP, Akt CIRA y Mek CCEK. Están disponibles servicios comerciales para determinar si un compuesto inhibe estas y otras proteínas cinasas usando métodos convencionales. Por ejemplo, se pueden usar Merck Millipore's Kinase Profiler™ y la versión 54 de sus protocolos de Ensayo sobre Servicio.

Preferentemente, el compuesto tiene un valor de Cl₅₀ de > 1 μ M, y más preferentemente > 5 μ M o > 10 μ M para al menos una si no todas las enzimas enumeradas a las que no se une sustancialmente.

Se prefiere si el compuesto tiene una Cl₅₀ <1 μ M contra la MAP cinasa p38 α humana. Es más preferido si el compuesto tiene una Cl₅₀ <0,1 μ M, preferentemente <0,05 μ M, más preferentemente <0,01 μ M, y todavía más preferentemente <0,001 μ M, como se mide usando la siguiente metodología. La Cl₅₀ se calcula probando el grado de inhibición de una concentración fija de la MAP cinasa p38 α usando concentraciones crecientes del compuesto. Cuando se representa en una escala logarítmica con el grado inhibición en el eje y y la concentración de péptido en el eje x, esto normalmente proporcionará una curva sigmoide desde 0 % de inhibición a la concentración 0 o la más baja hasta 100 % de inhibición a las dosis más altas. El punto al que se logra el 50 % de inhibición se denomina la concentración inhibidora a 50 o Cl₅₀ y se usa para establecer la potencia de un compuesto a una concentración fija de enzima.

Como se trata con más detalle en el Ejemplo 8, el compuesto HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) (BB2702) tiene una Cl₅₀ de 0,007 μ M, y muestra selectividad muy alta por la MAP cinasa p38 α . Sin desear quedar ligado a teoría alguna, el inventor cree que esta alta selectividad es debida en parte a la unión del compuesto a un sitio sobre la MAP cinasa p38 α que no está presente en otras proteínas cinasas, y no al sitio de unión de ATP. Se cree que el sitio está conservado entre la MAP cinasa p38 α humana y la MAP cinasa p38 α canina. El sitio de unión de ATP es un sitio de unión de ATP conservado encontrado en todas las proteínas cinasas y también muchas proteínas de unión de ATP, y así puede estar presente en cientos de proteínas en el proteoma humano (o canino). Como el sitio se encuentra en muchas proteínas diferentes, y como es responsable de la unión de ATP, es muy desafiante para producir compuestos inhibidores selectivos que bloquean la unión de ATP a la proteína y así previenen la actividad enzimática. Por otra parte, los sitios fuera del sitio activo son de mucha mayor diversidad y frecuentemente solo se asocian a una única proteína diana. Por tanto, un sitio fuera del sitio activo sobre la MAP cinasa p38 α puede ser el único sitio de esta naturaleza en el proteoma humano (o canino), sin homología significativa con otros de dichos sitios, y así ofrece la posibilidad de selectividad muy alta de compuestos que se unen a él. Así, la inhibición de la MAP cinasa p38 α por la unión de un compuesto en un sitio de unión poco usual, y posiblemente único, ofrece la probabilidad mucho mayor de inhibición selectiva de la MAP cinasa p38 α y, por tanto, evitar los efectos secundarios inespecíficos y la toxicidad.

También se describe un método de inhibición de la MAP cinasa p38 α , comprendiendo el método poner en contacto dicha cinasa con un compuesto como se ha descrito anteriormente. Normalmente, el método se lleva a cabo *in vitro*. Así, los compuestos descritos encuentran usos como reactivos para analizar la MAP cinasa p38 α . También se describe un kit de partes para analizar la MAP cinasa p38 α , comprendiendo el kit un compuesto como se describe y un sustrato para la MAP cinasa p38 α . Los sustratos adecuados para la MAP cinasa p38 α incluyen proteína básica de mielina (MBP), MK2/MAPKAPK2, MNK-1, PRAK y MSK1. MBP es un sustrato preferido. También se describe el uso de un compuesto como se ha descrito anteriormente para inhibir la MAP cinasa p38 α .

- Se conoce la inhibición de la MAP cinasa p38 α por ser terapéuticamente útil, particularmente en el tratamiento de afecciones inflamatorias. Así, también se describen compuestos para su uso en medicina para tratar un individuo. El individuo puede ser un humano o un animal no humano, tal como un mamífero no humano. Debido al grado de similitud de la secuencia de aminoácidos (99,4 % de identidad) con la MAP cinasa p38 α humana (MK14_HUMAN SEQ ID NO: 18) y la MAP cinasa p38 α canina (MK14_CANFA SEQ ID NO: 19) (véase Figura 1), los compuestos son particularmente aptos para el tratamiento del hombre y perros. Los compuestos también pueden ser útiles para tratar otros animales que tienen una MAP cinasa p38 α con similitud de secuencias sustancial (por ejemplo, >90% de identidad) con la secuencia enzimática humana.
- Los compuestos se pueden usar tanto solos como en combinación con otros compuestos terapéuticos. Así, también se describe una composición que comprende un compuesto descrito y uno o varios de otros compuestos terapéuticos, tales como compuestos antiinflamatorios o antiinfecciosos (por ejemplo, antibacterianos o antivirales) o antiproliferativos.
- También se describe una composición farmacéutica que comprende un compuesto descrito, o la composición descrita anteriormente, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable. El (Los) excipiente(s) y vehículo(s) deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con el compuesto y no perjudiciales para sus receptores. Se pueden seleccionar excipientes farmacéuticos y vehículos adecuados como se conoce en la técnica dependiendo de la vía de administración para el compuesto o la composición y si el compuesto o composición es para uso humano o veterinario.
- Se pueden administrar los compuestos descritos o una formulación de los mismos por cualquier método convencional, como se trata más abajo en más detalle. El tratamiento puede consistir en una dosis única o administración o una pluralidad de dosis o administraciones durante un periodo de tiempo.
- La formulación puede estar en una dosificación unitaria que contiene una dosis diaria o unidad, subdosis diarias, o una fracción apropiada de las mismas, del principio activo.
- Los compuestos descritos se administrarán normalmente por vía tópica o por vía oral, o por cualquier vía parenteral, en forma de una formulación farmacéutica, opcionalmente en forma de un ácido no tóxico orgánico, o inorgánico, o base, sal de adición, en una forma farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del trastorno e individuo que se va a tratar, así como la vía de administración, las composiciones se pueden administrar a dosis variables.
- Por ejemplo, los compuestos descritos se pueden administrar por vía oral, por vía bucal, por vía intranasal, por vía intraocular, por vía tópica, por vía rectal o por vía sublingual, en forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, disoluciones o suspensiones, que pueden contener aromatizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Los compuestos también se pueden administrar por inyección intracavernosa.
- Dichos comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato cálcico, fosfato de calcio dibásico y glicina, disgregantes tales como almidón (preferentemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato sódico de almidón, croscarmelosa sódica, y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes de la granulación tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y goma arábiga. Además, se pueden incluir agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.
- También se pueden emplear composiciones sólidas de un tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina. A este respecto, los excipientes preferidos incluyen lactosa, almidón, una celulosa, azúcar de la leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los compuestos se pueden combinar con diversos edulcorante o aromatizantes, materia colorante o colorantes, con emulsionante y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de los mismos.
- Los compuestos también se pueden administrar por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa, por vía intrarterial, por vía intraperitoneal, por vía intratecal, por vía intraventricular, por vía intraesternal, por vía intratorácica, por vía intracraneal, por vía intramuscular, por vía subcutánea o por vía intradérmica, o se pueden administrar por técnicas de infusión. Se pueden usar en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales suficientes o glucosa para hacer la disolución isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas deben ser adecuadamente tamponadas (preferentemente hasta un pH de desde 3 hasta 9), si fuera necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas en condiciones estériles se realiza fácilmente por técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas para los expertos en la técnica.
- Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en dosis unitaria o recipientes multi-dosis, por ejemplo ampollas y viales sellados, y se pueden almacenar en una condición secada por congelación (liofilizada) que solo requiere la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de uso. Se pueden preparar disoluciones o suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo previamente descrito.

Los compuestos también se pueden administrar por vía intranasal o por inhalación y convenientemente se administran en forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de spray en aerosol de un recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación se puede determinar proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. El recipiente presurizado, bomba, spray o nebulizador puede contener una disolución o suspensión del compuesto activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el propulsor como disolvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo, trioleato de sorbitano. Se pueden formular cápsulas y cartuchos (hechas, por ejemplo, de gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador para contener una mezcla en polvo de un compuesto descrito y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones en polvo de aerosol o secas preferentemente están dispuestas de manera que cada dosis medida o "descarga" contenga al menos 1 µg del compuesto para la administración al paciente. Se apreciará que la dosis diaria general con un aerosol variará de paciente a paciente, y se puede administrar en una dosis única o, más normalmente, en dosis divididas a lo largo del día.

Alternativamente, los compuestos se pueden administrar en forma de un supositorio o pesario, o se pueden aplicar por vía tópica en forma de una loción, disolución, crema, pomada o polvo para espolvorear. Los compuestos también se pueden administrar por vía transdérmica, por ejemplo, usando un parche dérmico. También se pueden administrar por vía ocular, particularmente para tratar enfermedades del ojo.

Para uso oftálmico, los compuestos se pueden formular usando sistemas de nanopartículas o como suspensiones micronizadas en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado, o, preferentemente, como disoluciones en solución salina estéril isotónica, de pH ajustado, opcionalmente en combinación con un conservante tal como un cloruro de bencilalconio. Alternativamente, se pueden formular en una pomada tal como vaselina.

Para administración por vía tópica a la piel, los compuestos se pueden formular como una pomada adecuada que contiene el compuesto activo suspenso o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, vaselina líquida, vaselina filante, propilenglicol, compuesto de polioxietileno-polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Alternativamente, se puede formular como una loción o crema adecuada, suspensa o disuelta en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua. Los compuestos también se pueden formular con nanopartículas que tienen calidades de penetración demostradas en tejidos y células.

Además, para administración por vía tópica, los compuestos (tanto solos como en combinación con otros principios activos o materiales) se pueden aplicar a, o impregnar dentro de, un apósito para heridas, de manera que se proporcione un apósito que se puede usar para tratar una afección inflamatoria o mejorar la cicatrización en un individuo.

Las formulaciones adecuadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar que comprenden el principio activo en una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábica o tragacanto; pastillas que comprenden el principio activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábica; y enjuagues bucales que comprenden el principio activo en un vehículo líquido adecuado.

Los compuestos se pueden administrar usando un sistema de administración inyectable de liberación sostenida de fármacos. Estos se diseñan específicamente para reducir la frecuencia de inyecciones. Un ejemplo de dicho sistema es Nutropin Depot que encapsula hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectado, liberan rhGH lentamente durante un periodo sostenido.

Los compuestos se pueden administrar por un dispositivo quirúrgicamente implantado que libera el fármaco directamente al sitio requerido. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente en el ojo para tratar retinitis por CMV. La administración directa de este agente tóxico al sitio de enfermedad logra terapia eficaz sin los significativos efectos secundarios sistémicos del fármaco.

También se pueden emplear sistemas de terapia por electroporación (EPT) para la administración de péptidos. Un dispositivo que suministra un campo eléctrico pulsado a células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares al fármaco, dando como resultado un potenciamiento significativo de la administración intracelular de fármacos.

Se pueden administrar péptidos por electroincorporación (EI). La EI ocurre cuando pequeñas partículas de hasta 30 micrómetros de diámetro sobre la superficie de la piel experimentan impulsos eléctricos idénticos o similares a los usados en la electroporación. En la EI, estas partículas son conducidas a través del estrato córneo y en capas más profundas de la piel. Las partículas se pueden cargar o recubrir con fármacos o genes o pueden simplemente actuar de "balas" que generan poros en la piel a través de los cuales pueden entrar los fármacos.

Un método alternativo de administración de péptidos es el sistema inyectable ReGel, que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable, mientras que a la temperatura corporal forma inmediatamente un depósito de gel que se erosiona lentamente y se disuelve en polímeros biodegradables seguros conocidos. El fármaco activo se administra con el tiempo a medida que se disuelven los biopolímeros.

- 5 Los compuestos se pueden introducir a células por "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos denominados penetrinas que tienen propiedades de translocación y son capaces de llevar compuestos hidrófilos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite el direccionamiento directo de oligopéptidos al citoplasma y núcleo, y puede no ser específico de tipo de célula y altamente eficiente. Véase Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87, incorporado en el presente documento como referencia.
- 10 La cantidad del compuesto a administrar al individuo se puede determinar por el profesional médico (doctor o veterinario) y dependerá de si el individuo es un humano o animal (y el tipo de animal), la afección que se va a tratar y la vía y frecuencia de administración. Convenientemente, el compuesto se puede administrar a la piel en formulación de vehículo de manera que se administren desde 10 µg hasta 100 mg en vehículo formulación por 2 cm² de área de inflamación, por ejemplo 100 µg, 1 mg, 5 mg, 10 mg o 50 mg.
- 15 También se describe un método de tratamiento de una afección inflamatoria en un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo un compuesto o una composición como se ha descrito. El individuo se puede administrar con los compuestos descritos y el otro compuesto terapéutico o secuencialmente en cualquier orden o simultáneamente.
- 20 También se describe un compuesto, o una composición como se ha descrito anteriormente, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria en un individuo. El individuo puede haber sido administrado o está siendo administrado o se administrará con otro agente terapéutico como se trata anteriormente.
- También se describe el uso del compuesto descrito, o una composición como se describe, en la fabricación de un medicamento para tratar una afección inflamatoria en un individuo. El individuo puede haber sido administrado o está siendo administrado o se administrará con otro agente terapéutico como se ha tratado anteriormente.
- 25 Las afecciones inflamatorias que se va a tratar incluyen aquellas en las que la vía inflamatoria que contiene la MAP cinasa p38α desempeña una función en su patología. Las afecciones inflamatorias para el tratamiento por los compuestos descritos incluyen, pero no se limitan a, trastornos inflamatorios de la piel tales como dermatitis atópica, psoriasis, acné vulgar, cicatrización dérmica. La activación de la MAP cinasa p38α también puede desempeñar una función fundamental en otros trastornos que implican la inflamación, que incluyen enfermedad pulmonar obstructiva
- 30 constrictiva, asma, enfermedad inflamatoria del intestino, aterosclerosis, cáncer y artritis reumatoide, y estas afecciones también se pueden tratar usando los compuestos descritos. La afección inflamatoria que se trata puede ser una afección temporal, regular o permanente experimentada por un individuo.
- También se describe un método de identificación de una molécula que se une a la MAP cinasa p38α, comprendiendo el método determinar si la molécula se une o no a la MAP cinasa p38α en la posición que un
- 35 compuesto como se ha descrito anteriormente se une a la MAP cinasa p38α.
- Las preferencias para el compuesto para su uso en cualquiera de los métodos, usos o composiciones anteriormente descritos son las mismas que para los compuestos descritos anteriormente.
- Se prefiere que el compuesto usado en el método para identificar una molécula que se une a la MAP cinasa p38α sea el péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, aunque se pueden usar otros compuestos descritos.
- 40 El método se puede usar para identificar moléculas que son útiles para inhibir selectivamente la MAP cinasa p38α, y que son útiles en terapia antiinflamatoria. Existen diversas formas de identificar si una molécula de prueba se une a la MAP cinasa p38α en la misma posición que el péptido con secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1. Una forma es realizar ensayos bioquímicos de competición entre la molécula de prueba y un compuesto como se ha descrito anteriormente, tal como el péptido con secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, u otro compuesto como se ha
- 45 descrito anteriormente, para determinar si la molécula de prueba es capaz de desplazar el péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, u otro compuesto como se ha descrito anteriormente, desde su sitio de unión sobre la MAP cinasa p38α, por ejemplo, usando el método de polarización de fluorescencia tratado anteriormente. Normalmente, el péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, u otro compuesto como se ha descrito anteriormente, se marca con una marca detectable, tal como fluorescente. Se usan un ensayo basado en afinidad, o un ensayo inmunoenzimático (ELISA). Otra forma es usar química computacional. Se puede usar información
- 50 estructural de alta resolución producida por cristalización de rayos X o resonancia magnética nuclear bidimensional para construir un modelo computacional preciso de la MAP cinasa p38α y el enlace preciso de un péptido tal como BB2702. El enlace del péptido revela puntos de interacción clave que entonces se pueden usar para enlazar computacionalmente moléculas pequeñas y otros péptidos. Esto permitirá la selección de compuestos que incluyen
- 55 péptidos que pueden explotar el mismo sitio y superficies de interacción clave sin la necesidad de cribar muchos millones de compuestos. Entonces se pueden cribar además moléculas candidatas que se cree que tienen una alta probabilidad de inhibir la MAP cinasa p38α, por ejemplo usando un ensayo de fosforilación bioquímico clásico.

Una vez se identifica una molécula, normalmente se llevan a cabo análisis adicionales. Por ejemplo, se pueden llevar a cabo las siguientes etapas: (a) determinación del valor de CI_{50} de la molécula para la MAP cinasa p38 α , (b) determinar su efecto sobre la estimulación de TNF en células Hela, (c) estudios de RMN de la unión a MAP cinasa p38 α , (d) análisis de selectividad hacia la MAP cinasa p38 α , (e) análisis de rayos X de la molécula y (f) estudios de cocristalización de la molécula y la MAP cinasa p38 α , que incluyen estudios de difracción de rayos X.

Se pueden sintetizar y estudiar adicionalmente las moléculas que se identifican. Las moléculas preferidas son las que se unen selectivamente a MAP cinasa p38 α , tienen una CI_{50} de $<1 \mu M$, preferentemente $<0,1 \mu M$, más preferentemente $<0,05 \mu M$, todavía más preferentemente $<0,01 \mu M$ y aún todavía más preferentemente $<0,001 \mu M$ y no inhiben sustancialmente ninguno de Jnnk, PKCd, p38b, AMPK, AurA, GK3b, RAF1, JNK3, VEGF, p38g, PKCb, PKCa, PDHK2, PDK1, MKK6, p27 KIP, Cdk2, Prak, Chk1, Egfr, Kdr, EGF, Zap 70, IGFR, Src, Fak, Jak3, Akt CIRA, y Mek. Por ejemplo, las moléculas preferidas son aquellas con un valor de CI_{50} de $> 1 \mu M$, y más preferentemente $> 5 \mu M$ o $> 10 \mu M$ para al menos una, si no todas, de las enzimas enumeradas que la molécula no inhibe sustancialmente.

El método puede comprender además la etapa de formular el compuesto identificado en una composición farmacéuticamente aceptable. También se describe un método de preparación de una composición farmacéutica que contiene una molécula identificada usando el método para identificar una molécula que se une a la MAP cinasa p38 α , comprendiendo el método la etapa de mezclar la molécula así identificada con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención se describirá ahora en una forma no limitante por referencia a las siguientes Figuras y Ejemplos.

Figura 1: Alineamiento de secuencias de aminoácidos de la MAP cinasa p38 α humana y canina. Existen 358 posiciones idénticas entre la secuencia humana y de perro (99,44 % de identidad);

Figura 2: Datos de barrido de alanina;

Figura 3: Efecto de BB2702 sobre la MAP cinasa p38 α fosforilada basal;

Figura 4: Medición de la afinidad de unión usando análisis BIAcore. Unión de OH-p38 α a BB2702;

Figura 5: Estructura de ureidoquinazolina del documento de patente WO 01/04102; y

Figura 6: Inhibición de la producción de TNF α en células THP-1 estimuladas por LPS por BB2702. Eje X nM BB2702: 1=1000 nM; 2=100 nM; 3=10 nM; 4=1 nM; 5=sin estimulación de LPS. Eje Y producción de TNF α en pg/mL

Ejemplo 1: Péptidos

Se prepararon los siguientes péptidos usando química sintética convencional.

1. BB2700 SRALLIFQKI (SEQ ID NO: 17) (N-acetilado)
2. BB2702 HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) (N-acetilado)

Ejemplo 2: Experimentos de barrido de alanina

La secuencia de aminoácidos de BB2702 es: HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) y está N-acetilada. El barrido de alanina permite que se forme una relación estructura:actividad del péptido. Sustituyendo secuencialmente cada aminoácido del péptido activo con el aminoácido más pequeño que tiene una cadena lateral, alanina, y probando la actividad del nuevo péptido, se puede crear una imagen de qué posiciones del resto de aminoácido son importantes para la actividad y qué posiciones no. Así, por ejemplo, si los presentes inventores sustituyen la arginina de la posición 4 con alanina, los presentes inventores observan un gran impacto negativo sobre la capacidad del nuevo péptido para inhibir la MAP cinasa p38 α . Así, los presentes inventores pueden llegar a la conclusión de que la arginina de la posición 4 es un punto de interacción importante del péptido en la unión a e inhibición de la MAP cinasa p38 α . Como esto se lleva a cabo para cada una de las 18 posiciones en el péptido BB2702, así, los presentes inventores formaron el conocimiento de los sitios claves de restos sobre el péptido necesario para inhibición de la MAP cinasa p38 α . Usando este enfoque, se muestran los restos clave en la secuencia para la unión. Los restos en las posiciones en negrita subrayados debajo son muy importantes para la unión con alta afinidad a MAP cinasa p38 α y se determinaron por experimentación por barrido de alanina y evaluación de la actividad en un ensayo bioquímico para evaluar la capacidad para inhibir la MAP cinasa p38 α . Son importantes los restos en las posiciones en cursiva subrayados, pero con influencia más pequeña en la unión.

H K S R A L L / F Q K I M W L R R Q

Ejemplo 3: Ensayo de MAP cinasa P38 α

MATERIALES

MKK6

- 5 Proteína de fusión de GST expresada en *E. coli*. Disolución madre 12 mg/mL. Almacenar a -80 °C (actividad basal de MKK6 suficiente para activar P38 α).

MAP cinasa P38 α

Proteína marcada con 6-his C-myc expresada en *E. coli*. Disolución madre 10 mg/mL. Almacenar a -80 °C.

Proteína básica de mielina (MBP) (GibcoBRL 13228-010)

25 mg disueltos en 3,75 mL de tampón cinasa (con β -ME)

- 10 γ -³³P-ATP (Amersham AH9968 250 uCi)

ATP (Sigma A-7699)

Disolución madre 1 mM en agua destilada en vaso. Almacenar a -80 °C.

Acetato de magnesio (Sigma M-0631)

Disolución madre 1 M en agua. Almacenar a 4 °C.

- 15 *Ácido tricloroacético (TCA) (Sigma 490-10)*

Preparar tanto una disolución al 20 % como al 2 % en agua. Almacenar a temperatura ambiente.

Tampón cinasa

- 20 EGTA 0,1 mM (Sigma E-4378). Tris/HCl 50 mM a pH 7,4 (Sigma T-4003). Disolución 0,1 mM de ortovanadato de sodio (Sigma S-6508). Almacenar a 4 °C. Inmediatamente antes de uso, añadir 1 μ L de β -mercapto-etanol (Sigma M-7522) por mL de tampón. [0,038 g (38 mg) de EGTA (SIGMA E-4378). 7,58 gm de TRIS/HCl prefijado a pH 7,4 (SIGMA T-4003). 0,018 g (18 mg) de ortovanadato de sodio (SIGMA S-6508). Enrasar hasta 1 litro en agua destilada en vaso. Inmediatamente antes de uso, añadir 1 μ L de β -mercaptoetanol (Sigma M-7522) por mL de tampón. Almacenar a 4 °C.]

Placas de 96 pocillos

- 25 Para su uso con DMSO (Corning incorporated (Costar) 3365 (polipropileno).
Placas de ensayo (Corning incorporated (Costar) 3596 (poliestireno – fondo plano con tapa). Placas filtrantes (Cambarra Packard 6005174 (con filtro GF/C unido)).

Ejemplo 4: Protocolo de MAP cinasa p38 α (Versión 1) (concentración de enzima 6,5 μ g/mL)

Activación de enzimas

- 30 Se activa la MAP cinasa p38 α humana antes de uso por incubación con MKK6 durante 3 horas a 30 °C. El incubado de activación contiene 550 μ L de tampón cinasa, 75 μ L (1 mM) de ATP, 75 μ L (100 mM) de MgAc, 50 μ L (10 mg/mL) de P38 α y 5 μ L (12 mg/mL) de MKK6. Este incubado de activación se puede separar en alícuotas y almacenar a -20 °C.

Método

- 35 El compuesto de referencia es SB203580 (Cl₅₀ = 0,025 μ M)
Se enrasan los *compuestos* a 10 mM en DMSO: Peso (mg)/MWt X 100 = Cantidad (mL) de DMSO a añadir.
Se hacen diluciones sucesivas en DMSO (1ª placa de dilución)
. *En una placa de 96 pocillos (polipropileno).
*100 μ L de DMSO en todas las filas excepto la primera fila.
40 *50 μ L de compuesto en el primer pocillo con DMSO.
*50 μ L a través de la placa con mezcla.

Entonces se diluyen 1:10 estas diluciones sucesivas en tampón cinasa (2ª placa de dilución).

*En una placa de 96 pocillos (poliestireno).

*90 µL de tampón cinasa en todas las filas necesarias.

*10 µL de diluciones de compuesto (Fila 3 - 1) (20 µM - 0,006 µM (concentración final)).

- 5 Se añadieron 10 µL de 10 % de DMSO en tampón cinasa a los pocillos de control 'máximo' y 'mínimo'.

Enrasar la disolución de enzima de trabajo: Para cada placa de 96 pocillos mezclar 2,50 mL de tampón cinasa, 500 µL de proteína básica de mielina (6,66 mg/mL en tampón cinasa) y 50 µL de P38α activado (la enzima activada se sustituye por tampón cinasa en pocillos de control 'mínimos'). Añadir 30 µL a todos los pocillos de ensayo.

- 10 *Preparar disolución de ATP marcada:* Para cada placa de 96 pocillos añadir 50 µL de MgAc (1 M), 900 µL de agua destilada, 50 µL de ATP (1mM) y 5 µCi (0,5 - 1 µL) de γ ³³P-ATP.

Añadir 10 µL a todos los pocillos.

Sellar e incubar la(s) placa(s) a temperatura ambiente durante 60 min con agitación suave (agitador de placas).

Detener la reacción con adición de 50 µL por pocillo de 20 % de disolución de TCA. *100 mL de TCA + 400 mL de agua milli Q.

- 15 Capturar MBP precipitado sobre una placa filtrante usando un colector Microcell. Usar 2 % de TCA (aproximadamente 100 mL) para lavar toda la placa y 0,75 % de ácido fosfórico (aproximadamente 100 mL) para el aclarado final del colector. Dejar secar las placas durante la noche.

Añadir 25 µL de Micro-scintillant a cada pocillo de prueba y leer en un contador de centelleo topcount (recuentos por minuto).

- 20 **Ejemplo 5: Protocolo de MAP cinasa 38α (Versión 2) (concentración de enzima 0,5 ug/mL)**

Activación de enzimas

- 25 Se activa la MAP cinasa p38α humana antes de uso por incubación con MKK6 durante 3 horas a 30 °C. El incubado de activación contiene 550 µL de tampón cinasa, 75 µL (1 mM) de ATP, 75 µL (100 mM) de MgAc, 50 µL (10 mg/mL) de P38α y 5 µL (12 mg/mL) de MKK6. Este incubado de activación se puede separar en alícuotas y almacenar a - 20 °C.

Método

El compuesto de referencia es SB203580 (CI50 = 0,025 uM)

Se enrasan los *compuestos* a 10 mM en DMSO.

Peso (mg)/MWt X 100 = Cantidad (mL) de DMSO a añadir

- 30 Se hacen diluciones sucesivas en DMSO (1ª placa de dilución)

. *En una placa de 96 pocillos (polipropileno).

*100 µL de DMSO en todas las filas excepto la primera fila.

*50 µL de compuesto en el primer pocillo con DMSO.

*50 µL a través de la placa con mezcla.

- 35 Entonces se diluyen 1:10 estas diluciones sucesivas en tampón cinasa (2ª placa de dilución).

*En una placa de 96 pocillos (poliestireno).

*90 µL de tampón cinasa en todas las filas necesarias.

* Se transfieren 10 µL de diluciones de compuesto (Fila 5 - 12) (2,22 µM - 0,001 µM (concentración final)) y se mezclan.

- 40 Se transfieren 10 µL desde la placa de dilución 2 hasta las placas de ensayo (por duplicado) (concentración final 2 % de DMSO).

Se añadieron 10 µL de 10 % de DMSO en tampón cinasa a los pocillos de control 'máximo' y 'mínimo'.

Preparación de la disolución de enzima de trabajo: Para cada placa de 96 pocillos mezclar 2,55 mL de tampón cinasa, 500 µL de proteína básica de mielina (6,66 mg/mL en tampón cinasa) y 3,8 µL de P38α activada (la enzima activada se sustituye por tampón cinasa en pocillos de control 'mínimo'). Añadir 30 µL a todos los pocillos de prueba.

- 5 *Preparar disolución de ATP marcado:* Para cada placa de 96 pocillos añadir 50 µL de MgAc (1 M), 900 µL de agua destilada, 50 µL de ATP (1mM) y 5 µCi (0,5 - 1 µL) de γ ³³P-ATP.

Añadir 10 µL a todos los pocillos

Sellar e incubar la(s) placa(s) a temperatura ambiente durante 60 min con agitación suave (agitador de placas).

Detener la reacción con adición de 50 µL por pocillo de 20 % de disolución de TCA. *100 mL de TCA + 400 mL de agua milli Q.

- 10 Capturar MBP precipitado sobre una placa filtrante usando un colector Microcell. Usar 2 % de TCA (aproximadamente 100 mL) para lavar toda la placa y 0,75 % de ácido fosfórico (aproximadamente 100 mL) para el aclarado final del colector. Dejar secar las placas durante la noche.

Añadir 25 µL de Micro-scintillant a cada pocillo de prueba y leer en un contador de centelleo topcount (recuentos por minuto).

15 **Ejemplo 6: Efecto de BB2702 sobre la actividad de p38α basal en células Hela**

- Se usan células Hela para modelar ciertos aspectos de la respuesta inflamatoria, tales como la producción de citocinas. En particular, la producción de citocinas inflamatorias TNFα, IL-1α, IL-1β, IL-6 y IL-8 en respuesta a lipopolisacáridos (LPS) u otros estímulos proinflamatorios. Esto puede ser mediante medios dependientes o independientes de la MAP cinasa p38α. Frecuentemente, se usa el inhibidor de molécula pequeña de cinasas MAP
- 20 p38α SB203580 para explorar la función de la MAP cinasa p38α en esta cascada de señalización inflamatoria. La Figura 3 mira el efecto de BB2702 sobre el estado de fosforilación de p38α basal en células Hela. p38α fosfo es la forma activa de p38α capaz de señalizar aguas abajo y que da como resultado la producción de citocinas inflamatorias. Los presentes inventores han demostrado en la Tabla 2 (en el Ejemplo 8 a continuación) que BB2702 inhibe la activación de p38α en un ensayo bioquímico. Aquí, los presentes inventores demuestran que BB2702
- 25 debilitó la fosforilación de p38α en un modelo celular en ausencia de cualquier estímulo, demostrándose así la reducida actividad de p38α en presencia de BB2702. Los presentes inventores pueden llegar a la conclusión a partir de estos datos que BB2702 está causando la supresión de actividad de p38α basal.

Como se muestra en la Figura 3, BB2702 reduce p38α activado basal. BB2702 previene la fosforilación de la MAP cinasa p38α por su cinasa de activación aguas arriba, por ejemplo, MKK6 o MKK3, o por autofosforilación.

30 **Ejemplo 7: Análisis BIAcore de la interacción entre BB2702 y la MAP cinasa p38α**

- Se usó un Biacore 3000 para detectar las interacciones de unión usando inhibición en ensayos de disolución (ISAs; Karlsson, R. (1994) Real-time competitive analysis of interactions between low-molecular-weight ligands in solution and surface immobilized receptors. Anal. Biochem. 221, 142-151). Se inmovilizó sobre el chip sensor un compuesto de definición diana (un compuesto de ureidoquinazolinona, Figura 5) que se sabía que se unía al sitio de purina de
- 35 cinasas. Se incubó la MAP cinasa p38α con diversas concentraciones de compuestos de prueba durante 30 min y luego se dejó circular sobre el sensor. Se asoció p38α sin unir al compuesto de definición diana dando una señal, que se podría relacionar con la libre concentración. Se analizaron los datos de dosis-respuesta para estimar los valores de K_d (por ejemplo, 1 o 3, donde $K_i' = K_d$), debido a que la competición por el compuesto de definición diana no provocó un desplazamiento significativo en el punto central. Se inmovilizó el compuesto de definición diana por acoplamiento de amina sobre un chip CM-5 de calidad para investigación usando inyecciones de 7 min de una
- 40 mezcla de 11,5 mg/mL de N-hidroxisuccinimida con 75 mg/mL de clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, seguido por compuesto 400 µM en HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3,4 mM, 0,005 % (v/v) de tensioactivo P20, 4 % (v/v) de sulfóxido de dimetilo, y finalmente etanolamina 1 mM, pH 8,5, a un caudal de 5 µL/min. Los niveles de inmovilización normalmente fueron de aproximadamente 3000 unidades de resonancia. Se preparó una celda de flujo de referencia sin el compuesto de definición diana. Todas las
- 45 mediciones usaron un caudal de 20 µL/min, y se hicieron restas para eliminar el cambio del índice de refracción y el ruido de inyección. Se logró regeneración superficial inyectando 5 µL de NaOH 100 mM. Se calibró el chip con o p38α no fosforilado o fosforilado usando un punto de informe de 60 s, cuando la respuesta estuvo aumentando linealmente con el tiempo. La respuesta fue lineal hasta proteína al menos 400 nM. Se realizaron mediciones de K_d a
- 50 p38α 10-50 nM, y se confirmó que era 25 nM. Esta afinidad de unión no es incompatible con la K_i bioquímicamente derivada de 7 nM.

La Figura 4 muestra los resultados del análisis de BIAcore.

Ejemplo 8: Estudios de RMN de la unión de BB2702 a la MAP cinasa p38 α

BB2702 ($Cl_{50} = 1$ nM) para la inhibición de la activación de la MAP cinasa p38 α por MKK6 comparte un motivo de secuencia (LIFQKI) en común con el fragmento de interacción de PDK1 hidrófobo derivado de PRK2 o el motivo de unión del sitio 'PIF' implicado en la activación de la cinasa de sustrato por PDK1 (Balendran et al. (1999) Curr. Biol. 9, 393-402). En la estructura cristalina de PDK1 (Biondi et al. (2002) EMBO J. 21(16), 4219-28), la hélice α G de una molécula PDK1 relacionada con la simetría ocupa el sitio de unión del motivo hidrófobo sobre la parte 'trasera' del lóbulo del extremo N del dominio catalítico, imitando la interacción intermolecular con cinasas de sustrato. Sin embargo, la MAP cinasa p38 α carece de un bolsillo de unión de motivo hidrófobo equivalente: esta región del lóbulo del extremo N de la MAP cinasa p38 α es en su lugar ocupada por su propia hélice del extremo C, así parece poco probable que la potente unión de este péptido BB2702 a MAP cinasa p38 α esté mediada por una interacción equivalente.

Por otra parte, estructuras cristalinas de péptidos del factor de transcripción MEF2A y otros sustratos de la MAP cinasa p38 α y, más recientemente, del complejo entre la MAP cinasa p38 α y MK2, han revelado que la MAP cinasa p38 α posee una acanaladura de enlace del sustrato sobre el lóbulo del extremo C, proximal al sitio de unión de ATP (Chang et al. (2002) Mol. Cell. 9(6), 1241-9; ter Haar et al. (2007) J. Biol. Chem. 282(13), 9733-9). Los presentes inventores razonaron que esta acanaladura de enlace podría ser un posible sitio de interacción entre BB2702 y la MAP cinasa p38 α , a pesar de la ausencia de la obvia similitud de secuencias con los motivos de enlace sustrato-cinasa de la MAP cinasa p38 α conocidos. Para investigar esto, los presentes inventores usaron RMN para monitorizar las perturbaciones del desplazamiento químico (CSPs) de la amida del esqueleto del espectro de la MAP cinasa p38 α inducido uniendo los péptidos BB2702 y MEF2A. Las concentraciones subestequiométricas del péptido BB2702 indujeron cambios de desplazamiento químico en el límite de intercambio lento sobre la escala de tiempo de RMN, de acuerdo con la unión de alta afinidad (<1 μ M) y, como era de esperar, los desplazamientos estuvieron esencialmente saturados a estequiometría 1:1 (datos no mostrados). La unión del péptido MEF2A reveló un patrón similar de CSPs al inducido por el péptido BB2702: se afectaron muchas de las mismas resonancias de la cinasa, sugiriendo que los dos péptidos podrían compartir un sitio de unión similar, o de solapamiento. Además, de acuerdo con la unión del péptido MEF2A a la acanaladura de enlace de la cinasa, los CSPs fueron notablemente diferentes de los de los inhibidores de p38 competitivos de ATP de molécula pequeña (Sullivan et al. (2005) Biochemistry 44(50), 16475-90). Sin embargo, a diferencia del péptido de BB2702, la unión del péptido MEF2A es mucho más débil, con una K_d estimada de datos de valoración de RMN de 250 μ M. Para probar además la relación entre los sitios de unión para péptidos MEF2A y BB2702, los presentes inventores añadieron entonces péptido BB2702 a una muestra de la MAP cinasa p38 α con péptido MEF2A preunido. BB2702 (240 μ M) fue capaz de desplazar completamente el péptido MEF2A (5 mM), recapitulando el patrón de CSP de la unión del péptido BB2702 solo (Figura 5B). A diferencia, y de acuerdo con su afinidad más débil, el péptido MEF2A (1 mM) fue incapaz de desplazar el péptido BB2702 (150 μ M) como se determinó por CSPs no alteradas, cuando se invirtió el orden de adición (datos no mostrados). Tomados conjuntamente, los datos de RMN soportan la hipótesis de que el péptido BB2702 se puede unir en, o próximo a, una acanaladura sobre p38 α usada para enlace con un regulador de cinasa aguas arriba.

Detalles experimentales

Se valoró BB 2702 en muestras de 6His-MAP cinasa p38 α uniformemente marcada con $^{15}N, ^2H$ (120 μ M) (Sullivan et al. (2005) Biochemistry 44(50), 16475-90), tanto por sí mismas como además del péptido derivado del factor de transcripción MEF2A (Chang et al. (2002) Mol. Cell. 9(6), 1241-9) (RKPDLRVVIPSS). Se adquirieron espectros de RMN de $^1H-^{15}N$ TROSY-HSQC después de cada adición. Se registraron los experimentos de RMN a 298K en un espectrómetro Varian Inova de 600 MHz equipado con una criosonda de resonancia triple de HCN como se describe en Sullivan et al. (2005).

Ejemplo 9: Selectividad de BB2702

La Tabla 1 a continuación compara la actividad de 2 péptidos seleccionados y su capacidad para o inhibir la fosforilación y, por tanto, la activación de p38 α por debajo de MKK6 o MKK3. También muestra la capacidad de los péptidos codificados para inhibir la capacidad de p38 α activado para fosforilar varios sustratos. Los datos en la tabla muestran que BB2702 inhibe la fosforilación de p38 α por MKK6 pero no MKK3, además cualquier p38 α activo se inhibe directamente para prevenir la fosforilación de o MBP o MK2. Así, BB2702 trabaja tanto inhibiendo la activación de p38 α como inactivando p38 α activo.

Tablas 2 y 3 (a continuación): Se evaluó la capacidad de BB2702 para inhibir otras proteínas cinasas probando en más de 30 proteínas cinasa a 10 μ M de péptido. Esto es el panel de selectividad. Donde los inhibidores se unen al sitio de unión de ATP, se puede esperar una ausencia de selectividad con respecto a este número de cinasas. Sin embargo, BB2702 es inactivo frente a la mayoría de las dianas de cinasa hasta 10 μ M y de hecho solo se observa una ligera actividad en 6 cinasas, pero con en general 500 a 1000 veces de selectividad cuando se compara con p38 α . El efecto inespecífico más activo es contra p38 β , un miembro de la familia altamente homólogo de la familia de cinasas MAPK. Sin embargo, incluso aquí, la selectividad es más de 100 veces. En resumen, los presentes inventores pueden llegar a la conclusión de que BB2702 es extremadamente selectivo para la inhibición de p38 α .

Tabla 1

Péptido	Ci50 µM MKK6/OH-p38α (ACTIVACIÓN)	Ci50 µM MKK6/OH-p38γ (ACTIVACIÓN)	Ci50 µM MKK3/OH-p38α (ACTIVACIÓN)	Ci50 µM P-p38a/MBP (ACTIVIDAD)	Ci50 µM P-p38a/MK2 (ACTIVIDAD)	Ci50 µM P-p38b/MBP V2 (ACTIVIDAD)
BB2700	0,075 (0,067-0,085) 0,027 (0,17-0,31)	>100	>100	2,78 (1,9-4,1)	0,9 (0,7-1,3)	0,5 (con bg)
BB2702	Muy potente (fuera de intervalo) 0,001 (0,004-0,016)	6,8 (3-16)	19,4	0,07 (0,049-0,1)	0,02 (0,01-0,03)	0,5 (con bg) 0,3 (con bg) 0,3 (con bg)

El sombreado más oscuro en las columnas 2-4 indica el uso de MAP cinasa p38a no fosforilada, mientras que el sombreado más claro en las columnas 5-7 indica el uso de MAP cinasa fosforilada p38a.

Tabla 2

	P38a Act. CCEK	Jmk	PKCd	p38b	AMPK	AurA	GK3b	RAF1	JNK3	VEG F	p38g	PKCb	PKCa	PDHK2	PDK1	MKK6	P38a KIP
1	2,2																
2	0,007	>10	>10	>0,75	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	>10	~10	>10	0,150

Datos como Ci50 en µM, 1 = BB2700; 2 = BB2702. En las Tablas 2 y 3 el sombreado indica selectividad de la MAP cinasa p3α en el panel de selectividad de cinasa

Tabla 3

	P38a Act. 2,2	p27	Cdk2	Prak	Chk1	Egfr	Kdr	EGF	Zap70	IGFR	Src	Csk	Fac	Jak3	Akt	Mek	P38a
1	2,2																
2	0,007	>10	>10	>10	>10	4	7	>10	4	0,75	>10	3	>10	7	~10	>10	0,150

Datos como Ci50 en µM, 1 = BB2700; 2 = BB2702

Ejemplo 10: Inhibición de la producción de TNF α en células THP-1 estimuladas con LPS por BB2702

La Figura 6 ilustra que cuando células THP-1 se tratan con BB2702 en un modo dependiente de la dosis y luego se estimulan por LPS (lipopolisacárido), existe una reducción significativa en la producción de TNF α , una citocina inflamatoria que se sabe que está aguas abajo de p38 α . Esto demuestra que BB2702 puede inhibir la señalización inflamatoria mediada p38 α en el modelo de inflamación de células THP-1 aceptado.

Se pre-incubaron células THP-1 con diversas dosis de BB2702 (1, 10, 100 1000 nM) antes de la estimulación con LPS (10 μ g/mL) durante 5 horas. Se determinó TNF- α en sobrenadantes de células por duplicado por ELISA. Los datos se presentan como la media de 5 experimentos cada uno llevado a cabo por duplicado. La desviación estándar para cada uno entra dentro del 15 % de la media.

Listado de secuencias

<110> Blueberry Therapeutics Limited

<120> COMPUESTOS Y SUS USOS

<130> P54036WO/SNB

<150> GB1314610.5

<151> 15-08-2013

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

<400> 1

His	Lys	Ser	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Gln	Lys	Ile	Met	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	

Arg Gln

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido

<400> 2

His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

Arg

10

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido

<400> 3

20

His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

30

<400> 4

His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu
1 5 10 15

ES 2 761 599 T3

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Péptido
 <400> 5
 10
 His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido
 20
 <400> 6
 Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg Arg
 1 5 10 15
 Gln
 25 <210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido
 <400> 7

ES 2 761 599 T3

Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

<210> 8

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

10

<400> 8

Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met
1 5 10

15 <210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido

<400> 9

25 Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

35 <400> 10

ES 2 761 599 T3

His Ala Leu Ala Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp
1 5 10

<210> 11

<211> 18

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

10

<400> 11

His Lys Ser Arg Ala Leu Ala Ile Phe Gln Lys Ile Met Ala Leu Arg
1 5 10 15

Arg Gln

15 <210> 12

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<223> Péptido

<400> 12

Ala Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

25 Arg Gln

<210> 13

<211> 18

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 761 599 T3

<223> Péptido

<400> 13

His Lys Ser Arg Ala Ala Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

5 Arg Gln

<210> 14

<211> 18

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

15 <400> 14

His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Ala Arg
1 5 10 15

Arg Gln

<210> 15

20 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido

<400> 15

His Lys Ser Arg Ala Leu Leu Ile Phe Gln Lys Ile Met Trp Leu Arg
1 5 10 15

30 Ala Gln

<210> 16

ES 2 761 599 T3

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido

<400> 16

His	Lys	Ser	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Gln	Lys	Ile	Met	Trp	Leu	Arg
1				5					10					15	

10

Arg Ala

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido

20

<400> 17

Ser	Arg	Ala	Leu	Leu	Ile	Phe	Gln	Lys	Ile
1				5					10

25

<210> 18

<211> 360

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

30

ES 2 761 599 T3

Met	Ser	Gln	Glu	Arg	Pro	Thr	Phe	Tyr	Arg	Gln	Glu	Leu	Asn	Lys	Thr
1				5					10					15	
Ile	Trp	Glu	Val	Pro	Glu	Arg	Tyr	Gln	Asn	Leu	Ser	Pro	Val	Gly	Ser
			20					25					30		
Gly	Ala	Tyr	Gly	Ser	Val	Cys	Ala	Ala	Phe	Asp	Thr	Lys	Thr	Gly	Leu
		35					40					45			
Arg	Val	Ala	Val	Lys	Lys	Leu	Ser	Arg	Pro	Phe	Gln	Ser	Ile	Ile	His
	50					55					60				
Ala	Lys	Arg	Thr	Tyr	Arg	Glu	Leu	Arg	Leu	Leu	Lys	His	Met	Lys	His
65					70				75					80	

ES 2 761 599 T3

Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu
 85 90 95
 Glu Glu Phe Asn Asp Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp
 100 105 110
 Leu Asn Asn Ile Val Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Gln
 115 120 125
 Phe Leu Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
 130 135 140
 Asp Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu
 145 150 155 160
 Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp
 165 170 175
 Asp Glu Met Thr Gly Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
 180 185 190
 Ile Met Leu Asn Trp Met His Tyr Asn Gln Thr Val Asp Ile Trp Ser
 195 200 205
 Val Gly Cys Ile Met Ala Glu Leu Leu Thr Gly Arg Thr Leu Phe Pro
 210 215 220
 Gly Thr Asp His Ile Asp Gln Leu Lys Leu Ile Leu Arg Leu Val Gly
 225 230 235 240
 Thr Pro Gly Ala Glu Leu Leu Lys Lys Ile Ser Ser Glu Ser Ala Arg
 245 250 255
 Asn Tyr Ile Gln Ser Leu Thr Gln Met Pro Lys Met Asn Phe Ala Asn
 260 265 270
 Val Phe Ile Gly Ala Asn Pro Leu Ala Val Asp Leu Leu Glu Lys Met
 275 280 285
 Leu Val Leu Asp Ser Asp Lys Arg Ile Thr Ala Ala Gln Ala Leu Ala
 290 295 300
 His Ala Tyr Phe Ala Gln Tyr His Asp Pro Asp Asp Glu Pro Val Ala
 305 310 315 320
 Asp Pro Tyr Asp Gln Ser Phe Glu Ser Arg Asp Leu Leu Ile Asp Glu
 325 330 335
 Trp Lys Ser Leu Thr Tyr Asp Glu Val Ile Ser Phe Val Pro Pro Pro
 340 345 350
 Leu Asp Gln Glu Glu Met Glu Ser
 355 360

ES 2 761 599 T3

<211> 360

<212> PRT

<213> Canis lupus

5

<400> 19

```

Met Ser Gln Glu Arg Pro Thr Phe Tyr Arg Gln Glu Leu Asn Lys Thr
 1          5          10          15

Ile Trp Glu Val Pro Glu Arg Tyr Gln Asn Leu Ser Pro Val Gly Ser
          20          25          30

Gly Ala Tyr Gly Ser Val Cys Ala Ala Phe Asp Thr Lys Thr Gly Leu
          35          40          45

Arg Val Ala Val Lys Lys Leu Ser Arg Pro Phe Gln Ser Ile Ile His
 50          55          60

Ala Lys Arg Thr Tyr Arg Glu Leu Arg Leu Leu Lys His Met Lys His
65          70          75          80

Glu Asn Val Ile Gly Leu Leu Asp Val Phe Thr Pro Ala Arg Ser Leu
          85          90          95

Glu Glu Phe Asn Asp Val Tyr Leu Val Thr His Leu Met Gly Ala Asp
          100          105          110

Leu Asn Asn Ile Val Lys Cys Gln Lys Leu Thr Asp Asp His Val Gln
          115          120          125

Phe Leu Ile Tyr Gln Ile Leu Arg Gly Leu Lys Tyr Ile His Ser Ala
          130          135          140

Asp Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Pro Ser Asn Leu Ala Val Asn Glu
          145          150          155          160

Asp Cys Glu Leu Lys Ile Leu Asp Phe Gly Leu Ala Arg His Thr Asp
          165          170          175

Asp Glu Met Thr Gly Tyr Val Ala Thr Arg Trp Tyr Arg Ala Pro Glu
          180          185          190

```

ES 2 761 599 T3

Ile	Met	Leu	Asn	Trp	Met	His	Tyr	Asn	Gln	Thr	Val	Asp	Ile	Trp	Ser	195	200	205
Val	Gly	Cys	Ile	Met	Ala	Glu	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Thr	Leu	Phe	Pro	210	215	220
Gly	Thr	Asp	His	Ile	Asp	Gln	Leu	Lys	Leu	Ile	Leu	Arg	Leu	Val	Gly	225	230	235
Thr	Pro	Gly	Ala	Asp	Leu	Leu	Lys	Lys	Ile	Ser	Ser	Glu	Ser	Ala	Arg	245	250	255
Asn	Tyr	Ile	Gln	Ser	Leu	Thr	Gln	Met	Pro	Lys	Met	Asn	Phe	Ala	Asn	260	265	270
Val	Phe	Ile	Gly	Ala	Asn	Pro	Leu	Ala	Val	Asp	Leu	Leu	Glu	Lys	Met	275	280	285
Leu	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Lys	Arg	Ile	Thr	Ala	Ala	Gln	Ala	Leu	Ala	290	295	300
His	Ala	Tyr	Phe	Ala	Gln	Tyr	His	Asp	Pro	Asp	Asp	Glu	Pro	Val	Ala	305	310	315
Asp	Pro	Tyr	Asp	Gln	Ser	Phe	Glu	Ser	Arg	Asp	Leu	Leu	Ile	Asp	Glu	325	330	335
Trp	Lys	Ser	Leu	Thr	Tyr	Asp	Glu	Val	Val	Ser	Phe	Val	Pro	Pro	Pro	340	345	350
Leu	Asp	Gln	Glu	Glu	Met	Glu	Ser									355	360	

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de unión de la MAP cinasa p38 α que comprende la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) o que comprende una parte de dicha secuencia de aminoácidos de 10 o más aminoácidos contiguos, o que comprende una variante de dicha secuencia de aminoácidos o de dicha parte de la misma en la que han sido alterados desde 1 hasta 2 aminoácidos, en donde en comparación con las posiciones en SEQ ID NO:1, la posición 2 es K, la posición 4 es R, la posición 8 es I, la posición 9 es F, la posición 10 es Q, la posición 13 es M y la posición 16 es R.
2. Un compuesto según la reivindicación 1 que:
 - (i) tiene un peso molecular inferior a 25.000 dáltones; y/o
 - (ii) es sustancialmente resistente a la digestión con proteasas.
3. Un compuesto según la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que consiste en la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1) o una parte de dicha secuencia de aminoácidos de 10 o más aminoácidos contiguos, o una variante de dicha secuencia de aminoácidos o dicha parte de la misma en la que han sido alterados desde 1 hasta 2 aminoácidos, en donde el compuesto se une a la MAP cinasa p38 α .
4. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que consiste en la secuencia de aminoácidos HKSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 1).
5. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, seleccionado del grupo que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos: HKSRALLIFQKIMWLRR (SEQ ID NO: 2), HKSRALLIFQKIMWLR (SEQ ID NO: 3), HKSRALLIFQKIMWL (SEQ ID NO: 4), HKSRALLIFQKIMW (SEQ ID NO: 5), KSRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 6), SRALLIFQKIMWLRRQ (SEQ ID NO: 7), SRALLIFQKIM (SEQ ID NO: 8), SRALLIFQ (SEQ ID NO: 9), HALAIFQKIMW (SEQ ID NO: 10) o HKSRALAIFQKIMALRRQ (SEQ ID NO: 11).
6. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que contiene:
 - al menos un enlace no peptídico entre aminoácidos; y/o
 - al menos un resto de D-aminoácido.
7. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde:
 - se bloquea el resto del extremo N y/o C; y/o
 - el compuesto es un péptido unido a otro resto.
8. Una composición que comprende un compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y uno o más compuestos terapéuticos adicionales, tales como compuestos antiinflamatorios, antiinfecciosos, tales como antibacterianos, o antiproliferativos.
9. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición según la reivindicación 8, para su uso en medicina.
10. Una composición farmacéutica que comprende un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición según la reivindicación 8, y un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o una composición según la reivindicación 8, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria en un individuo.
12. Un método de identificación de una molécula que se une a la MAP cinasa p38 α , comprendiendo el método determinar si la molécula se une a la MAP cinasa p38 α en la misma posición que un compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 se une a la MAP cinasa p38 α , en donde el método comprende:
 - un ensayo de competición bioquímica;
 - un ensayo basado en afinidad;
 - un ensayo inmunoenzimático (ELISA); o
 - química computacional.

Figura 1

1	MSQERPTFYRQELNKTIEWEPERYQNLSPVGSGAYGSVCAAFDTKTGURVAVKKLSRPFQ	60	Q16539	MK14_HUMAN
1	MSQERPTFYRQELNKTIEWEPERYQNLSPVGSGAYGSVCAAFDTKTGURVAVKKLSRPFQ	60	O02812	MK14_CANFA

61	SIHAKRTYRELRLKHKMKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLTHMGADLNIVKQ	120	Q16539	MK14_HUMAN
61	SIHAKRTYRELRLKHKMKHENVIGLLDVFTPARSLEEFNDVYLTHMGADLNIVKQ	120	O02812	MK14_CANFA

121	KLTDHVVQFLIYQILRLGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLARHTDEMT	180	Q16539	MK14_HUMAN
121	KLTDHVVQFLIYQILRLGLKYIHSADIIHRDLKPSNLAVNEDCELKILDFGLARHTDEMT	180	O02812	MK14_CANFA

181	GYVATRWPYPAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAEILLTGRILFFGTDHIDQKLILRLVG	240	Q16539	MK14_HUMAN
181	GYVATRWPYPAPEIMLNWMHYNQTVDIWSVGCIMAEILLTGRILFFGTDHIDQKLILRLVG	240	O02812	MK14_CANFA

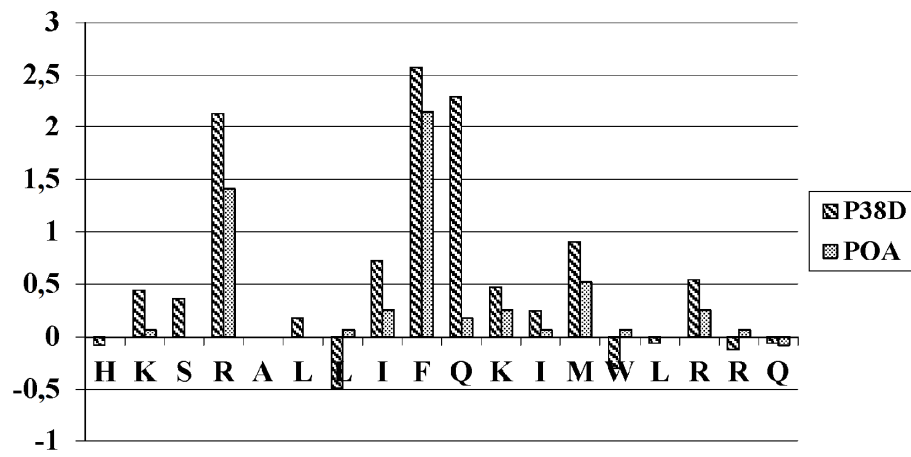
241	TPGAELIKKISSESARNVIQSLTQMPKMFANVFIGANPLAVDLLEKMLVLDSDKRITAA	300	Q16539	MK14_HUMAN
241	TPGADLLKKISSESARNVIQSLTQMPKMFANVFIGANPLAVDLLEKMLVLDSDKRITAA	300	O02812	MK14_CANFA

301	QALAHAYFAQYHDPDEFVADPYDQSFESRDLLIDENKSLTYDEVISFVPPFDQEEEMES	360	Q16539	MK14_HUMAN
301	QALAHAYFAQYHDPDEFVADPYDQSFESRDLLIDENKSLTYDEVISFVPPFDQEEEMES	360	O02812	MK14_CANFA

Q16539 MK14_HUMAN = SEQ ID No: 18
O02812 MK14_CANFA = SEQ ID No: 19

Figura 2

Barrido de alanina: $\text{Log}(K_{\text{mutante}}) - \text{Log}(K_{\text{parental}})$



Barrido de alanina: Rueda helicoidal

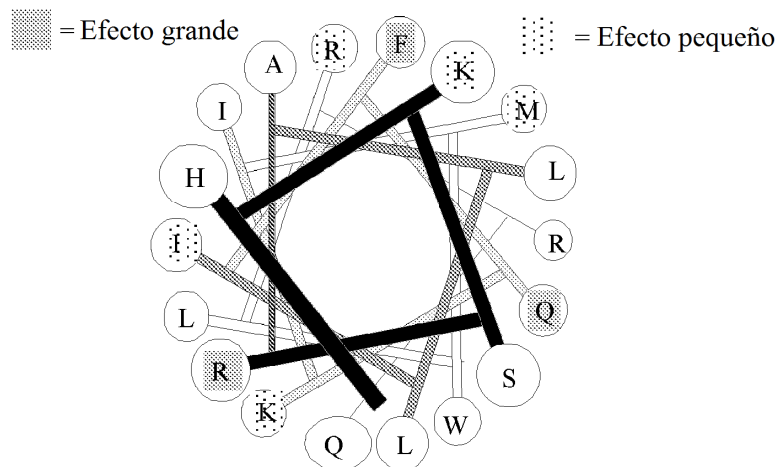


Figura 3

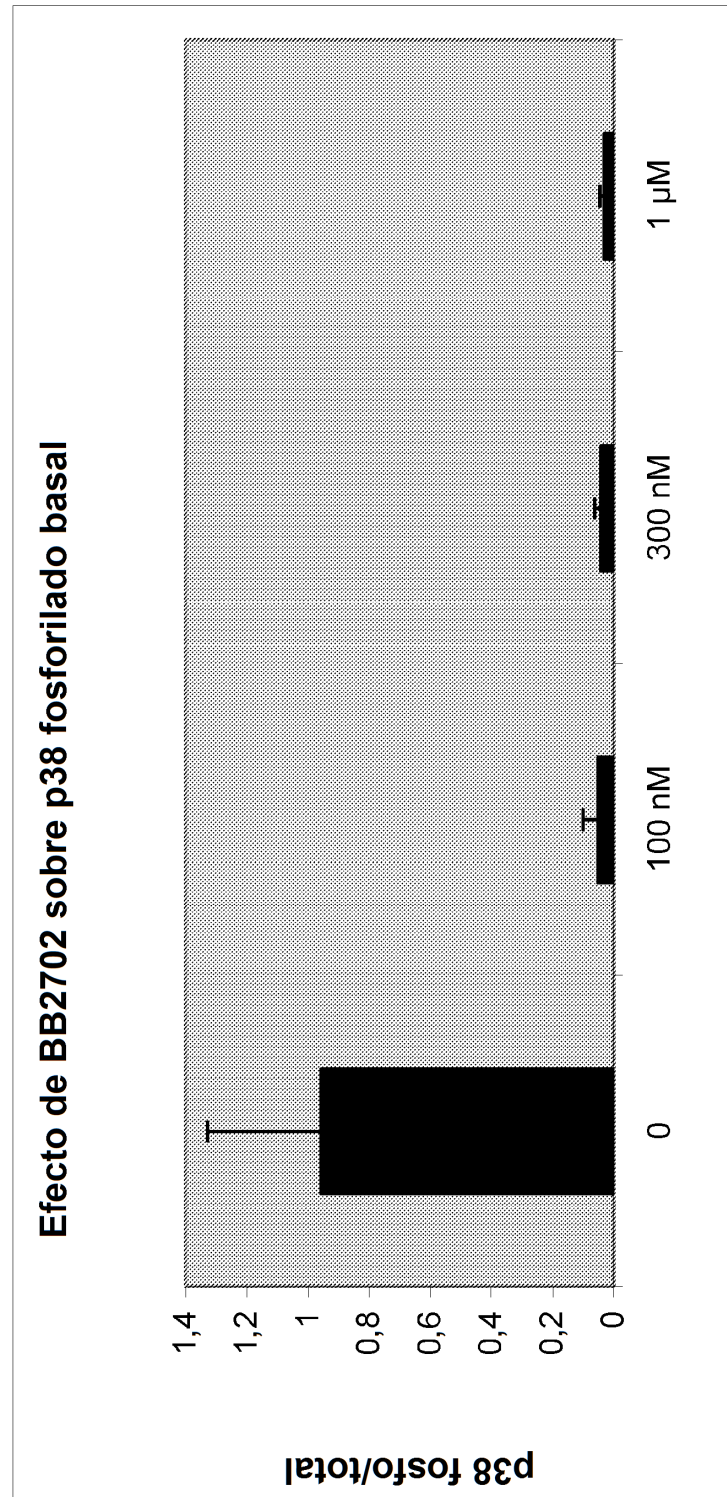


Figura 4

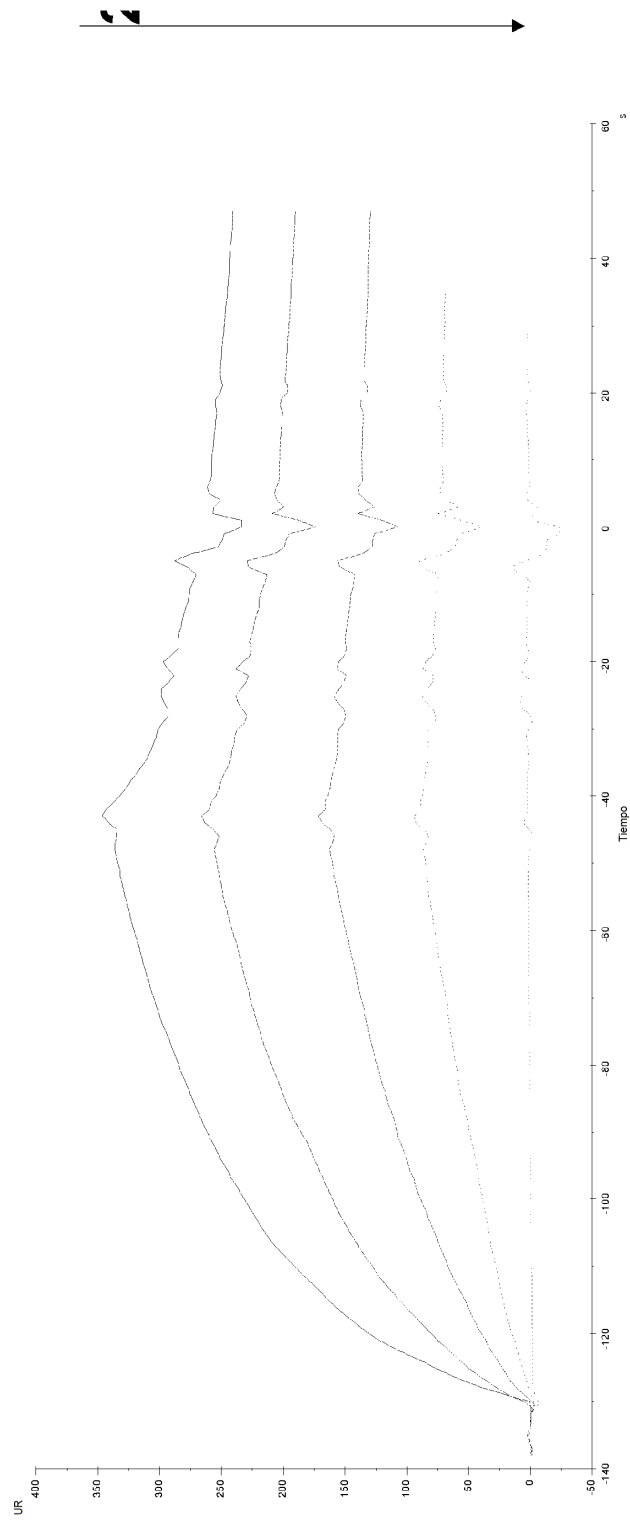


Figura 5

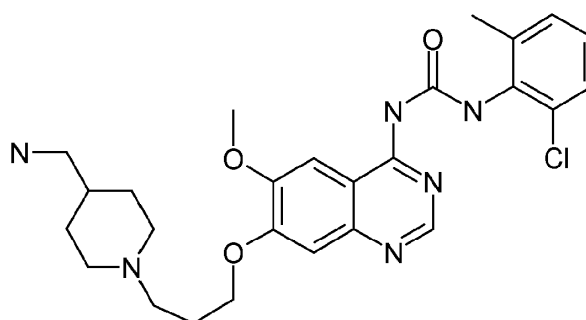


Figura 6

