

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 892 025**

21 Número de solicitud: 202030775

51 Int. Cl.:

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

27.07.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

01.02.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

28.06.2023

Fecha de concesión:

07.07.2023

45 Fecha de publicación de la concesión:

14.07.2023

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**GARCÍA MARÍN, Javier;
ALAJARÍN FERRÁNDEZ, Ramón;
VAQUERO LÓPEZ, Juan José;
GRIERA MERINO, Mercedes;
DE FRUTOS GARCÍA, Sergio;
RODRÍGUEZ PUYOL, Manuel y
RODRÍGUEZ PUYOL, Diego**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **COMPUESTOS QUE SE UNEN A LA ILK Y MODULAN LA INTERACCIÓN ILK/ALFA-PARVINA Y LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA**

57 Resumen:

La presente invención está relacionada con compuestos de Fórmula I que se unen a ILK y modulan la unión a alpha-parvina, con el uso de dichos compuestos como moduladores del efecto que la Quinasa Ligada a Integrina (ILK) ejerce sobre la polimerización de actina, y con el uso de composiciones farmacéuticas que contienen dichos compuestos para su uso en medicina, concretamente en enfermedad renal crónica.

H-AA1- Tyr-AA3-Val-Pro-Leu-His-OH

donde:

- AA1 y AA3 son Ala y Phe respectivamente, o

- AA1 y AA3 son Gly y Ala respectivamente.

Fórmula I

ES 2 892 025 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

COMPUESTOS QUE SE UNEN A LA ILK Y MODULAN LA INTERACCIÓN ILK/ALFA-PARVINA Y LA POLIMERIZACIÓN DE ACTINA

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención está relacionada con el campo de compuestos bioactivos de interés en el sector farmacéutico y en medicina. Más concretamente, la invención está relacionada con compuestos capaces de unirse a la Quinasa Ligada a Integrinas (ILK), modular su interacción con alfa-parvina y modular la actividad de la ILK sobre la polimerización de actina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

La Quinasa Ligada a Integrinas (ILK) es un componente central de las adhesiones focales, también conocidas como adhesiones a la matriz extracelular (ECM), que se expresa ampliamente y se conserva evolutivamente. Las adhesiones focales son complejos supramoleculares que unen la matriz extracelular a los filamentos de actina y regulan la organización del citoesqueleto y las respuestas celulares diversas dependientes de éste, tales como la adhesión celular, el cambio de la forma celular, migración, proliferación y supervivencia. Como proteína adaptadora intracelular, la ILK actúa a través de interacciones proteína-proteína uniendo los receptores de adhesión celular, integrinas y factores de crecimiento al citoesqueleto de actina y a una variedad de vías de señalización. Por ello, la ILK regula la unión integrina-actina, el ensamblaje en los focos de adhesión, la organización del citoesqueleto, la dinámica de los microtúbulos y la señalización. Las proteínas en las adhesiones focales tienen funciones sinérgicas, pero trabajos recientes indican que estas proteínas podrían tener también roles separados dentro de la célula. Funcionan como reguladores de la transcripción de genes o la adhesión célula-célula. Estas funciones son esenciales para procesos tales como la migración celular y la remodelación de la ECM.

La ILK ha sido ampliamente reconocida como una diana terapéutica ya que está implicada notablemente en la progresión del cáncer, diabetes, fallo renal, inflamación y enfermedades cardiovasculares. El descubrimiento reciente de que los niveles de la ILK están incrementados en varios cánceres, y que la inhibición de la expresión y actividad de la ILK es antitumoral, hace de la ILK una diana atractiva para la terapia del cáncer. La ILK es una

seudoquinasa que contiene un sitio pseudoactivo incapaz de llevar a cabo la catálisis, imposibilitando el desarrollo de fármacos inhibidores de quinasa específicos para la ILK. A pesar de la falta de actividad kinasa, la ILK une Mg-ATP en el centro pseudoactivo y es capaz de utilizarlo para transducir señales no catalíticas para la modulación del citoesqueleto y de la dinámica de la adhesión celular. Como proteína adaptadora, la ILK se une a otras dos proteínas, PINCH y alfa-parvina, a través de interacciones proteína-proteína (PPIs) para formar un complejo trímero necesario para el desarrollo de las funciones de señalización y andamiaje celular. Una manera de modular las PPIs es a través de una molécula capaz de unirse a una de las proteínas en la zona de interacción, impidiendo la formación del complejo, o en un lugar distinto, provocando en este caso un cambio conformacional de la proteína que afecta a la conformación de la misma en la superficie de interacción, impidiendo o favoreciendo la formación del complejo. Dado que la ILK está muy regulada positivamente en varias enfermedades, es posible actuar terapéuticamente sobre estas enfermedades a través de compuestos capaces de modular los efectos de la ILK. Más concretamente, estos compuestos son capaces de modular el efecto que la ILK produce sobre la polimerización de actina y, en consecuencia, sobre vías importantes y procesos celulares disfuncionales en tales enfermedades. Además, como la ILK no tiene isoformas y está altamente concentrada especialmente en las adhesiones focales, los compuestos que alteran la adhesión celular dependiente de ILK pueden ser altamente efectivos en el tratamiento de enfermedades mediadas por esta proteína adaptadora, tal y como se recoge en los distintos ejemplos y aplicaciones que aparecen en las publicaciones y patentes internacionales desde 1998.

La técnica biofísica de resonancia de plasmón superficial (SPR) permite realizar medidas de afinidad y cinética entre dos moléculas (o biomoléculas) en tiempo real con una alta sensibilidad sin necesidad de ningún tipo de marcaje enzimático, fluorescente o radioactivo y utiliza cantidades de biomoléculas muy inferiores a las necesarias para realizar análisis similares por microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC). Por ello, esta técnica se ha utilizado fundamentalmente en la determinación de la afinidad de un sustrato o un inhibidor por una enzima o entre dos proteínas, así como de moduladores de las PPIs. La SPR utiliza biosensores sobre los que se inmoviliza la proteína o el ligando y se hace pasar una disolución del ligando o la proteína, respectivamente. En algunos métodos de esta técnica se pueden realizar medidas de la ruptura de un complejo proteína-proteína por un ligando o la ruptura de un complejo ligando-proteína por otra proteína. La técnica se basa en un

fenómeno óptico que permite la detección de cambios en el índice de refracción en las proximidades de la interfase entre un metal y un medio dieléctrico donde se encuentra el analito. Estos cambios, que son dependientes de las variaciones en la masa cuando tiene lugar la interacción, darán lugar a una variación en el ángulo de resonancia. La representación de la respuesta (en unidades de resonancia, RU) frente al tiempo da lugar a lo que se denomina sensograma, el cual proporciona información sobre la capacidad de interacción de las moléculas ensayadas con la proteína inmovilizada. Cuando un ligando se une a dicha proteína y da una respuesta en SPR, se pueden determinar su afinidad (KD) y cinética mediante la determinación de la respuesta en función de la concentración de ligando. De esta manera, la técnica de SPR puede determinar si un ligando se une a la ILK y la afinidad con la que lo hace. Un ligando que interfiera en las PPIs de la ILK debe también modular las funciones biológicas controladas por dicha interacción y, por ello, puede utilizarse como fármaco para el tratamiento de enfermedades relacionadas con dicha función.

Entre las distintas enfermedades en las cuales la ILK está implicada se ha descrito que en el área del cáncer la ILK participa en: el desarrollo de un fenotipo agresivo en tumores Phyllodes de mama vía transición mesénquima-epitelio; la proliferación, migración e invasión en cáncer de ovario; el comportamiento biológico maligno del cáncer de ovario; la modulación del comportamiento metastático del cáncer de epitelio ovárico; la progresión de tumor y resistencia a antitumorales en cáncer humano de células madre; la leucemia mieloide aguda, crónica y leucemia linfocítica crónica; la inducción de respuesta angiogénica en mieloma múltiple; el cáncer de mama; la modulación del desarrollo del cáncer de mama CSC (células madre cancerosas); el cáncer de vejiga; la EMT de cáncer de vejiga; el cáncer de páncreas y promoción de su progresión; la proliferación y EMT (transición epitelio-mesénquima) de células de glioma; el glioma; los procesos de invasión y metástasis de glioma; la proliferación, metástasis y capacidad de invasión de células de cáncer colorrectal; el carcinoma oral de células escamosas; la sensibilidad a la quimioterapia de la línea celular A549 de cáncer de pulmón; la resistencia a fármacos en cáncer de pulmón; el carcinoma de células renales; los carcinomas renales de células claras; la progresión maligna del cáncer de estómago; el cáncer colorrectal; el osteosarcoma; el cáncer de pulmón de células no pequeñas; el cáncer de laringe; y los cánceres agresivos de tiroides.

También se ha descrito que la ILK juega un papel importante en el área de los trastornos cardiovasculares como: cardiomiopatía arritmogénica (arritmia ventricular, fallo cardiaco y muerte súbita cardiaca); infarto de miocardio (mejora de la función y reorganización cardiaca en el tratamiento postinfarto); fibrosis de miocardio; enfermedad aterosclerótica; hipertrofia
5 cardiaca; enfermedad coronaria; miocarditis viral; cardiomiopatía dilatada; desarrollo de la hipertensión pulmonar hipóxica. Además, la ILK interviene en otros efectos de naturaleza cardiovascular: modulación de los efectos de angiotensina II en células de la musculatura lisa vascular; mejora de la función cardíaca dependiente de la edad; desarrollo adecuado de los vasos linfáticos.

10

En relación con el sistema renal, la ILK participa en: la progresión de la enfermedad renal crónica; fibrosis en la enfermedad renal poliquística; desarrollo renal-estromal y vascular; morfogénesis de las ramificaciones renales; senescencia renal de células del riñón; desarrollo y mantenimiento de la fibrosis renal; nefropatía obstructiva; disfunción endotelial
15 y uremia; enfermedad renal inflamatoria.

20

La ILK también es un actor importante en trastornos relacionados con: diabetes y resistencia baja a la insulina; captación de glucosa y sensibilidad a insulina periférica; opacificación de la cápsula posterior; resistencia a insulina hepática; retinopatía diabética; mejora de la
recuperación funcional de la cistopatía diabética.

25

A nivel de cerebro y sistema nervioso, la ILK está implicada en: la neurogénesis y la recuperación de la memoria (enfermedad de Alzheimer); discapacidad en memoria y plasticidad sináptica en el trastorno del espectro alcohólico fetal en ratas; desarrollo,
proliferación y diferenciación de las células precursoras de oligodendrocitos; regulación del citoesqueleto de oligodendrocitos, crecimiento del cono y dinámicas de adhesión; regulación de la maduración del podosoma y estabilidad en células dendríticas.

30

También, a nivel de la piel, la modulación de ILK controla: la contracción de heridas cutáneas; curación de quemaduras; prevención de infección cutánea por *Staphylococcus*; proliferación de queratinocitos y diferenciación; formación de escaras hipertróficas.

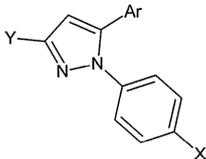
Otras enfermedades no menos importantes en las que la relación con la ILK ha sido, de momento, menos estudiada, son: en el sistema reproductivo, la patogénesis de la

endometriosis, la adenomiosis y la función eréctil; en los ojos, la formación de neovascularización coroidea, y la supervivencia de las células epiteliales del cristalino; en el envejecimiento, actuando sobre la longevidad y senescencia celular prematura inducida por estresantes celulares, y sobre la senescencia celular inducida por hiperfosfatemia; y en el mantenimiento del balance reducción/oxidación celular (estrés oxidativo).

Algunos documentos de la literatura patente relacionados con la presente invención son:

1. WO 2019147552 que se refiere a compuestos moduladores de la integrina ligada a quinasa (ILK), y métodos para tratar enfermedades con ellos, pero dichos compuestos no contienen aminoácidos.

2. WO 2012071310 que se refiere a inhibidores de integrina ligada a quinasa de fórmula



donde el resto "X" puede incluir aminoácidos, como agentes antitumorales.

3. WO2011057397 que se refiere a métodos para tratar o prevenir el daño cardíaco con composiciones de quinasa ligada a integrina.

4. WO2003045380 que se refiere a inhibidores de ILK para el tratamiento de la enfermedad renal.

5. WO2003045379 que se refiere a la preparación de hidrazono-diamino-pirazoles como inhibidores de la quinasa unidos a integrina con actividad antiproliferativa.

6. WO2003045432, que se refiere al tratamiento de la enfermedad oftálmica neovascular utilizando inhibidores de la quinasa unidos a integrina.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Esta invención está relacionada con compuestos capaces de activar la interacción entre la ILK y la alfa-parvina y que activan la polimerización de actina.

Más concretamente, en un primer aspecto, la invención se refiere a heptapéptidos que se corresponden con la Fórmula I

H-AA1- -Tyr-AA3- -Val-Pro-Leu - -His-OH

donde:

- AA1 y AA3 son Ala y Phe respectivamente, o
- AA1 y AA3 son Gly y Ala respectivamente.

Los compuestos de la invención se pueden preparar mediante la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida recogida en el modo de realización de esta invención, pero su preparación no se limita a este modo de realización, sino que se refleja en esta invención a modo de ejemplo, pudiendo prepararse también por la técnica de síntesis de péptidos en disolución, bien conocida entre los expertos en la materia en cualquiera de sus estrategias Fmoc/*t*-Bu o Boc/Bzl. Por otra parte, la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida ejemplificada en esta invención, no se limita a la resina cloruro de poliestiril-2-clorotritilo (Merrifield 2-clorotritilo), pudiéndose utilizar cualquier otro polímero funcionalizado de los que se usan habitualmente para la síntesis de péptidos a través de la estrategia conocida por los expertos en la materia como estrategia Fmoc/*t*-Bu o Boc/Bzl.

Por otro lado, los péptidos de la invención pueden definirse mediante los códigos y abreviaturas correspondientes a cada aminoácido y se indican en la lista de aminoácidos anteriormente mostrada.

Los compuestos de Fórmula I son capaces de unirse a ILK. La unión de dichos compuestos se establece de forma no covalente y puede determinarse mediante la técnica biofísica de resonancia de plasmón de superficie (SPR). Para ello, los compuestos de Fórmula I se hacen pasar, disueltos en una disolución tampón a una misma concentración, a través de un biosensor que contiene ILK humana completa inmovilizada y se leen las unidades (RU) de respuesta en el equipo de SPR. Cuando este experimento se repite a concentraciones variables del compuesto permite determinar los parámetros cinéticos de la unión, los cuales se pueden determinar a partir de las constantes cinéticas (ajuste cinético) o a partir de la respuesta en el equilibrio (ajuste por afinidad). El ajuste cinético se realiza tras sustraer la respuesta de fondo al fluir el analito y ajustarse a un modo de interacción uno-uno o Langmuir. El modelo de Langmuir define el proceso de unión entre el analito y el ligando mediante las constantes cinéticas de asociación (K_{on}) y disociación (K_{off}). Cuando se alcanza el equilibrio, las velocidades de asociación y disociación se igualan y permiten calcular la constante termodinámicas de afinidad. No obstante, en determinadas situaciones los datos del ajuste cinético pueden estar sometidos a un gran error ya que los procesos de

asociación y disociación son muy rápidos. En esta última situación se recurre al ajuste por afinidad que se lleva a cabo cuando se ha alcanzado el estado estacionario de la interacción.

Los compuestos de la invención actúan como activadores de la polimerización de actina. En este sentido, el efecto que los compuestos de la invención ejercen sobre la polimerización de actina puede ser examinado mediante la observación de la integridad de los filamentos de actina por microscopia confocal y cuantificada mediante el análisis densitométrico. Esto es lo que se ha demostrado en células mesangiales humanas (CMH) fijadas y teñidas con faloidina-FITC, pero el análisis no está restringido a estas células, sino que puede llevarse a cabo sobre cualquier otra línea celular que exprese ILK en cantidad suficiente para la observación del efecto. Un aumento de la polimerización de actina es indicativo de que ILK está activada y, al contrario, una disminución de la polimerización de actina es indicativo de que ILK está inhibida.

Algunos compuestos de Fórmula I son capaces de aumentar la polimerización de actina. Los métodos por los que dicho aumento de la polimerización se puede detectar y cuantificar, cómo se ha indicado, mediante la observación de la integridad de los filamentos de actina por microscopia confocal y cuantificada mediante el análisis densitométrico.

La invención también se refiere al compuesto definido anteriormente para su uso en medicina. De forma preferente se refiere al compuesto para su uso en el que dicho compuesto se une a la proteína ILK, y de forma más preferente, el compuesto interfiere en la unión entre las proteínas ILK y alfa-parvina, y dicho compuesto activa la polimerización de actina.

La invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende el compuesto definido anteriormente o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, o un profármaco del compuesto, o un polimorfo de cualquiera de los anteriores, o un solvato de cualquiera de los anteriores, y al menos un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El compuesto definido anteriormente, o una sal farmacéuticamente aceptable del compuesto, o un profármaco del compuesto, o un polimorfo de cualquiera de los anteriores, o un solvato de cualquiera de los anteriores o la composición farmacéutica que comprende

cualquiera de los anteriores son útiles en la prevención o tratamiento de una enfermedad en cuya patogénesis está implicada la ILK.

5 Las enfermedades en las cuales la ILK está implicada se seleccionan de la lista que comprende: tumores sólidos, discrasias de células hematológicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades crónicas.

10 El tumor sólido puede estar seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, glioma, cáncer colorrectal, carcinoma oral, carcinoma renal, cáncer de pulmón, cáncer de estómago, osteosarcoma, cáncer de laringe, cáncer de tiroides, cáncer de próstata, astrocitomas, gliomas, cáncer de mama, cáncer de piel y mieloma.

15 La discrasia de células hematológicas puede estar seleccionada entre leucemia mieloide, leucemia linfoide y mieloma.

La enfermedad autoinmune puede estar seleccionada entre colitis ulcerosa, psoriasis, esclerodermia, lupus eritematoso y artritis reumatoide.

20 La enfermedad crónica puede estar seleccionada entre hipertensión, cardiomiopatía hipertensiva e isquémica, arteriosclerosis, hipertensión pulmonar, fibrosis pulmonar, enfermedad renal crónica, enfermedad renal poliquística, diabetes y sus complicaciones, resistencia a la insulina, síndrome metabólico, enfermedades neurodegenerativas y diabetes insípida.

25

Según una realización preferente de la invención, la enfermedad es enfermedad renal crónica.

30 La invención también se refiere a la composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de las enfermedades en las que interviene la ILK será en una cantidad terapéuticamente efectiva.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas composiciones son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de composiciones terapéuticas.

5 Los compuestos de la invención, sus sales farmacéuticamente aceptables, sus profármacos - polimorfos de cualquiera de los anteriores, o solvatos de cualquiera de los anteriores, así como las composiciones farmacéuticas que los contienen, pueden ser utilizados junto con otros fármacos, o principios activos, adicionales para proporcionar una terapia de combinación. Dichos fármacos adicionales pueden formar parte de la misma composición
10 farmacéutica o, alternativamente, pueden ser proporcionados en forma de una composición separada para su administración simultánea o no a la de la composición farmacéutica que comprende un compuesto de la presente invención o un profármaco, solvato, derivado o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “cantidad terapéuticamente efectiva”
15 se refiere a la cantidad del agente o compuesto capaz de desarrollar la acción terapéutica determinada por sus propiedades farmacológicas, calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de los pacientes, incluyendo la edad, estado del paciente, la severidad de la alteración o trastorno, y de la ruta y frecuencia de administración.

20 Dicha composición terapéutica se puede preparar como una forma sólida o suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada, para lo cual dicha composición se formulará en la forma
25 farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la composición terapéutica proporcionada por esta invención se efectúa por vía oral, tópica, rectal o parenteral (incluyendo subcutánea, intraperitoneal, intradérmica, intramuscular, intravenosa, etc.). Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de medicamentos y de los excipientes necesarios para la obtención de las
30 mismas puede encontrarse, por ejemplo, en el “Tratado de Farmacia Galénica”, C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid, o en otros habituales o similares de las Farmacopeas Española y de Estados Unidos. Dado que los péptidos de la invención son péptidos solubles en agua una forma particular de administración es por vía intravenosa de

sus disoluciones acuosas para evitar hidrólisis en estómago, intestino y asegurar una concentración adecuada en sangre.

La presente invención se refiere también a un método para prevenir o tratar una enfermedad en cuya patogénesis interviene la ILK con un compuesto definido en la reivindicación 1, una sal farmacéuticamente aceptable, un solvato o profármaco de dicho compuesto, o una composición farmacéutica que comprende dicho compuesto, sal farmacéuticamente aceptable, solvato o profármaco del mismo, que comprende administrar a un individuo una cantidad terapéuticamente eficaz del compuesto, sal, solvato o profármaco del mismo.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Sensograma de los péptidos PEP1 (SEQ_ID: 1) a PEP7 (SEQ_ID: 7) a concentración 500 μ M.

Fig. 2. Sensograma de los experimentos de afinidad para el compuesto PEP1.

Fig. 3. Sensograma de los experimentos de afinidad para el compuesto PEP2 (SEQ_ID: 2).

Fig. 4. Sensograma de los experimentos de afinidad para el compuesto PEP4 (SEQ_ID: 4).

Fig. 5. Sensograma de los experimentos de afinidad para el compuesto PEP5 (SEQ_ID: 5).

Fig. 6. Sensograma del experimento de competición entre alfa-parvina y el compuesto PEP4.

Fig. 7. Efecto de los compuestos PEP2 y PEP4 sobre la polimerización de actina después de 24 horas de tratamiento. Las células fueron incubadas con una concentración 50 μ M de cada péptido durante 24 horas y fijadas y teñidas con faloidina-FITC. La integridad de los filamentos de actina fue analizada mediante microscopía confocal y su cuantificación mediante análisis densitométrico. En la parte superior se muestra una fotografía representativa de cada tratamiento y en la parte inferior el análisis densitométrico de todos los experimentos. Los resultados son la media \pm error estándar de seis experimentos independientes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Procedimiento general. La preparación de los compuestos de Fórmula I puede realizarse en fase sólida. El procedimiento comprende las siguientes etapas:

5 1. Anclaje del aminoácido C-terminal a una resina. La resina de Merrifield funcionalizada con un grupo 2-clorotritilo (cloruro de poliestiril 2-clorotritilo, 1.27-1.55 mmol/g, 100 mg, 0.127-0.155 mmol) hinchada previamente con N,N-dimetilformamida (DMF), se mezcla con una disolución del Fmoc-aminoácido que se encuentra en la posición C-terminal del correspondiente péptido (1.5 equivalentes, 0.22 mmol) en DMF anhidra (30 mL/g de resina)
10 y etildiisopropilamina (DIPEA, 3 equivalentes, 60 mg). La suspensión se agita durante 1.5 horas a temperatura ambiente. A continuación, se añade metanol (0.8 mL/g de resina) y se agita durante 30 minutos. Posteriormente, la mezcla se filtra y la resina se lava consecutivamente con DMF (3 x 3 mL x 3 min), metanol (3 x 3 mL x 3 min) y diclorometano (3 x 3 mL x 3 min).

15

2. Desprotección del grupo Fmoc. La resina obtenida en la etapa anterior se lava con una disolución de piperidina al 20% en DMF (3 mL) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtra y la resina se lava consecutivamente con DMF (3 x 3 mL x 3 min), metanol (3 x 3 mL x 3 min) y diclorometano (3 x 3 mL x 3 min).

20

3. Acoplamiento del segundo aminoácido. La resina obtenida en la etapa anterior, hinchada previamente con N,N-dimetilformamida (DMF), se trata con una mezcla formada por el Fmoc-AA2 (3 equivalentes) que se encuentra en la posición siguiente al extremo C-terminal, HCTU (3 equivalentes) y DIPEA (6 equivalentes) disueltos en DMF (30 mL/g de resina) y la
25 mezcla se agita 3 horas a temperatura ambiente hasta que el test de Kaiser indica que la reacción se ha completado. A continuación, la mezcla se filtra y la resina se lava consecutivamente con DMF (3 x 3 mL x 3 min), metanol (3 x 3 mL x 3 min) y diclorometano (3 x 3 mL x 3 min).

30 4. Desprotección del grupo Fmoc. La resina obtenida en la etapa anterior se lava con una disolución de piperidina al 20% en DMF (3 mL) y se agita durante 30 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtra y la resina se lava consecutivamente con DMF (3 x 3 mL x 3 min), metanol (3 x 3 mL x 3 min) y diclorometano (3 x 3 mL x 3 min).

5. Elongación de la cadena. La resina obtenida en la etapa anterior se trata tal y como se ha descrito en las etapas 4 y 5 con los sucesivos aminoácidos que componen los péptidos de Fórmula I seguido de la desprotección del grupo Fmoc, hasta alcanzar la longitud del correspondiente péptido.

5

6. Desanclaje de la resina y desprotección de las cadenas laterales. La resina obtenida en la etapa anterior se trata con una mezcla formada por una disolución de TFA/TIPS/H₂O 9:0.5:0.5 (3 mL, 30 mL/g de resina) y se agita durante 3 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se filtra, se evaporan los disolventes y el residuo se precipita con éter dietílico para dar un sólido blanco. La mezcla se centrifuga, se decanta el disolvente y se lava con éter dos veces. Finalmente, si es necesario, el producto se purifica mediante HPLC preparativo en fase reversa utilizando un gradiente de MeOH/agua.

Ejemplo 2. H-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (PEP1)

15 Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.33 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (23 mg, 46%) con un 100% de pureza (214 nm); H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.72 (d, J = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (d, J = 0.9 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.29 – 7.17 (m, 5H, ArH Phe), 7.03 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.68 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y H5 Tyr), 4.72 (dd, J = 7.7, 5.0 Hz, 1H, H α His), 4.61 (tap, J = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H α Phe), 4.60 (dd, J = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H α Tyr), 4.41 (m, 2H, H α Pro y Val), 4.26 (dd, J = 9.6, 5.6 Hz, 1H, H α Leu), 3.78 (m, 1H, CH₂ α Pro), 3.70 – 3.66 (m, 1H, CH₂ β Pro solapado con CH₂ α Gly), 3.63 (dd, J = 16.5 Hz, 2H, CH₂ Gly), 3.32 – 3.29 (m, 1H, CH₂ α His, solapado con disolvente), 3.16 (dd, J = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH₂ β His), 3.10 (dd, J = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH₂ α Phe), 3.02 (dd, J = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH₂ α Tyr), 2.94 (dd, J = 13.8, 8.0 Hz, 1H CH₂ β Phe), 2.74 (dd, J = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH₂ β Tyr), 2.20 (dd, J = 12.1, 7.8 Hz, 1H, CH₂ α β Pro), 2.10 – 2.00 (m, 2H, CH Val y CH₂ β Pro solapado), 2.00 – 1.87 (m, 2H, CH₂ γ Pro), 1.75 (dd, J = 13.5, 7.4 Hz, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.00 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.97 (d, J = 6.6 Hz, 6H, 2 x CH₃ Leu), 0.93 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 and C6 Tyr), 130.42 (Ar-C3 and C5 Phe), 129.39 (Ar-C2 and C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.81 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 and C5 Tyr), 61.31 (C α Pro), 57.84 (C α Val), 56.34 (C α Tyr), 55.76 (C α Phe), 53.76 (C α Leu), 53.09

(Ca His), 48.76 (CH₂δ Pro), 41.53 (Ca Gly), 41.35 (CH₂ Leu), 38.83 (CH₂ Phe), 38.27 (CH₂ Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 (CH₂β Pro), 28.02 (CH₂ His), 25.98 (CH₂γ Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH₃ Leu), 22.05 (CH₃ Leu), 19.70 (CH₃ Val), 19.01 (CH₃ Val); HRMS (ESI-TOF) m/z calculado para C₄₂H₅₈N₉O₉ [M+H]⁺: 832.4352. Encontrado [M+H]⁺: 832.4336.

5

Ejemplo 3. H-Ala-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (PEP2)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.27 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (66 mg, 90%) con un 70% de pureza (214 nm); H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 8.71

10 (d, *J* = 0.9 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (s, 1H, Ar-H5 His), 7.28 – 7.20 (m, 5H, ArH Phe), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y H5 Tyr), 4.70 (dd, *J* = 7.7, 5.0 Hz, 1H, Hα His), 4.61 (tap, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, Hα Phe), 4.59 (dd, *J* = 9.2, 5.5 Hz, 1H, Hα Tyr), 4.42 (m, 2H, Hα Pro y Val), 4.27 (dd, *J* = 9.6, 5.5 Hz, 1H, Hα Leu), 3.84 – 3.79 (m, 1H, CH₂δ Pro solapado con q, 1H, *J* = 14.2, 7.1 Hz, CH Ala), 3.68 – 3.64 (m, 1H, CH₂δ Pro), 3.32 – 3.29 (m, 1H, CH₂a His, solapado con disolvente), 3.16 (dd, *J* = 15.3, 7.8 Hz, 1H, CH₂b His), 3.10 (dd, *J* = 13.9, 6.3 Hz, 1H, CH₂a Phe), 3.03 (dd, *J* = 14.0, 5.4 Hz, 1H, CH₂a Tyr), 2.94 (dd, *J* = 13.8, 7.8 Hz, 1H CH₂b Phe), 2.79 (dd, *J* = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH₂b Tyr), 2.24 - 2.18 (m, 1H, CH₂aβ Pro), 2.10 – 1.99 (m, 2H, CH Val y CH₂bβ Pro solapado), 1.98 – 1.91 (m, 2H, CH₂γ Pro), 1.81 – 1.73 (m, CH Leu), 1.68 – 1.54 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.43 (d, *J* = 20 7.1 Hz, CH₃ Ala), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, CH₃ Leu and CH₃ Val), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Leu); C RMN (125 MHz, CD₃OD): 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (CO TFA), 156.11 (Ar-C4 Tyr)*, 138.63 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 y C6 Tyr), 131.38 (Ar-C3 y C5 Phe), 130.39 (Ar-C1 Tyr), 129.35 (Ar-C2 y C6 Phe), 25 127.61 (Ar-C4 Phe)*, 118.08 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 y C5 Tyr), 61.26 (Ca Pro), 57.20 (Ca Val), 56.43 (Ca Tyr), 55.66 (Ca Phe), 53.76 (Ca Leu), 53.09 (Ca His), 50.03 (Ca Ala), 49.63 (CH₂δ Pro), 41.35 (CH₂ Leu), 38.83 (CH₂ Phe), 38.27 (CH₂ Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 (CH₂β Pro), 28.22 (CH₂ His), 25.98 (CH₂γ Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH₃ Leu), 22.05 (CH₃ Leu), 19.70 (CH₃ Val), 19.01 (CH₃ Val), 17.69 (CH₃ Ala). *No se observa en C RMN rutinario.

30 Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; HRMS (ESI-TOF) m/z calculado para C₄₃H₅₉N₉O₉ [M+H]⁺: 846.4509. Encontrado [M+H]⁺: 846.4513 y [M+2/2]⁺: 423.7305.

Ejemplo 4. H-Gly-Ala-Phe-Val-Pro-Leu-His-OH (PEP3) (SEQ_ID: 3)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.33 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (54 mg, 64%) con un 50% de pureza (214 nm); H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.42 (d, *J* = 0.8 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.30 – 7.22 (m, 6H, 5 x ArH Phe y Ar-H5 His), 4.68 (dd, *J* = 7.9, 6.5 Hz, 1H, H α His), 4.61 (tap, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H α Phe), 4.44 – 4.42 (m, 2H, H α Pro y H α Val), 4.37 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, H α Ala), 4.26 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H, H α Leu), 3.78 - 3.75 (m, 1H, CH₂ α δ Pro), 3.69 (s, 2H, CH₂ Gly), 3.67 - 3.65 (m, 1H, CH₂ β δ Pro), 3.28-3.24 (m, 1H, CH₂ α His), 3.16 (dd, *J* = 6.7, 3.0 Hz, 1H, CH₂ β His), 3.10 (dd, *J* = 14.3, 8.1 Hz, 1H, CH₂ α Phe), 2.96 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H, CH₂ β Phe), 2.24 – 2.18 (m, 1H, CH₂ α β Pro), 2.07 - 2.02 (m, 2H, CH Val y CH₂ β β Pro), 1.97 – 1.93 (m, 2H, CH₂ γ Pro), 1.81 – 1.71 (m, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.32 (d, *J* = 7.2 Hz, 3H, CH₃ Ala), 1.00 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.98 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Leu), 0.96 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Leu); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 174.63 (CO), 174.41 (CO), 173.35 (CO), 173.12 (CO), 172.81 (CO), 172.60 (CO), 172.10 (CO), 167.00 (TFA), 136.38 (Ar-C1 Phe), 133.80 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 130.23 (Ar-C3 y C5 Phe), 129.98 (Ar-C2 y C6 Phe), 126.39 (Ar-C4 Phe), 118.53 (Ar-C4 His), 60.27* (C α Pro), 56.62* (C α Val), 52.83 (C α Phe), 52.46* (C α Leu), 53.09 (C α His), 49.13 (C α Ala), 47.63 (CH₂ δ Pro), 40.04 (C α Gly), 40.14 (CH₂ Leu), 37.15 (CH₂ Phe), 30.72 (CH Val), 29.19 (CH₂ β Pro), 27.15 (CH₂ His), 24.58 (CH₂ γ Pro), 24.41 (CH Leu), 21.93 (CH₃ Val), 20.57 (CH₃ Leu), 18.18 (CH₃ Val), 17.48 (CH₃ Leu), 16.72 (CH₃ Ala). *No se observa en C RMN rutinario. Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculado para C₃₆H₅₄N₉O₈ [M+H]⁺: 740.409. Found [M+H]⁺: 740.4065.

Ejemplo 5. H-Gly-Tyr-Ala-Val-Pro-Leu-His-OH (PEP4)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.55 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (23 mg, 46%) con un 100% de pureza (214 nm); H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.72 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.35 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.09 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.71 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y 5 Tyr), 4.69 (dd, *J* = 7.7, 5.0 Hz, 1H, H α His), 4.64 (tap, *J* = 9.6, 5.0 Hz, 1H, H α Tyr), 4.45 – 4.38 (m, 2H, H α Pro y Val), 4.40 (q, *J* = 7.4 Hz, 1H, H α Ala), 4.27 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H, H α Leu), 3.90 (m, 1H, CH₂ α δ Pro), 3.72 – 3.69 (m, 1H, CH₂ β δ Pro solapado con CH₂ α Gly), 3.63 (dd, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH₂ Gly), 3.32-3.29 (dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH₂ α His, solapado con disolvente), 3.17 (dd, *J* = 15.3, 7.7 Hz, 1H, CH₂ β His), 3.11 (dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH₂ α Tyr), 2.79 (dd, *J* = 14.2, 9.6 Hz, 1H,

CH₂b Tyr), 2.21 (m, 1H, CH₂aβ Pro), 2.10 – 2.04 (m, 2H, CH Val, CH₂bβ Pro solapado), 2.00 – 1.87 (m, 2H, CH₂γ Pro), 1.75 (m, 1H, CH Leu), 1.66 – 1.54 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.34 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃ Ala), 1.05 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH₃ Val), 1.01 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃), 0.93 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH₃); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ

5 172.45 (CO), 172.06 (CO), 171.20 (CO), 165.69 (CO TFA), 156.00 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Tyr), 134.23 (Ar-C2 His), 129.93 (Ar-C5 His), 129.97 (Ar-C2 y C6 Tyr), 118.53 (Ar-C4 His), 114.86 (Ar-C3 y C5 Tyr), 60.93* (Cα Pro), 57.84 (Cα Val), 54.94 (Cα Tyr), 52.29 (Cα Leu), 51.95 (Cα His), 48.88 (CHα Ala), 48.79 (CH₂δ Pro), 40.12 (CH₂ Leu), 39.56 (Cα Gly), 38.83 (CH₂ Phe), 38.27 (CH₂ Tyr), 30.47 (CH₂β Pro), 29.10 (CH Val), 26.71 (CH₂γ Pro), 24.32

10 (CH Leu), 23.39 (CH₃ Leu), 22.05 (CH₃ Leu), 19.70 (CH₃ Val), 19.01 (CH₃ Val), 16.48 (CH₃ Ala). *No se observa en C RMN rutinario. Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; Cuatro grupos CO no se observan en C NMR experiments; HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculado por C₃₆H₅₄N₉O₉ [M+H]⁺: 756.4039, [M+2/2]⁺: 378.7056. Encontrado [M+H]⁺: 756.4071 and [M+2/2]⁺: 378.7083.

15

Ejemplo 6. H-Gly-Tyr-Phe-Ala-Pro-Leu-His-OH (PEP5)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.55 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (29 mg, 52%) con un 100% de pureza (214 nm); H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.75

20 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.34 (d, *J* = 1.1 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.27 – 7.18 (m, 5H, ArH Phe), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.68 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y H5 Tyr), 4.70 (dd, *J* = 7.9, 5.1 Hz, 1H, Hα His), 4.64 – 4.60 (m, 2H, Hα Phe y Ala solapado), 4.56 (dd, *J* = 9.0, 5.7 Hz, 1H, Hα Tyr), 4.42 (dd, *J* = 8.2, 4.4 Hz, 1H, Hα Pro), 4.28 (dd, *J* = 9.7, 5.5 Hz, 1H, Hα Leu), 3.70 – 3.66 (m, 2H, CH₂δ Pro solapado con CH₂a Gly), 3.63 (dd, *J* = 16.1 Hz, 2H, CH₂ Gly), 3.32 3.30 (m, 1H, CH₂a His, solapado con disolvente), 3.18 – 3.12 (m, 1H, CH₂b His solapado con 1H, CH₂a Phe), 2.97 (dd, *J* = 14.1, 5.7 Hz, 1H, CH₂a Tyr), 2.91 (dd, *J* = 13.9, 8.7 Hz, 1H CH₂b Phe), 2.73 (dd, *J* = 14.1, 9.0 Hz, 1H, CH₂b Tyr), 2.20 (m, 1H, CH₂aβ Pro), 2.07 – 1.94 (m, 1H, CH₂bβ Pro solapado con 2H, CH₂γ Pro), 1.72 (m, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.35 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₃ Ala), 0.98 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH₃ Leu), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Leu); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 167.14 (CO TFA), 157.41 (Ar-C4 Tyr), 138.10 (Ar-C1 Phe), 134.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His)*, 131.12 (Ar-C2 y C6 Tyr), 130.42 (Ar-C3 y C5 Phe), 129.40 (Ar-C2 y C6 Phe), 128.63 (Ar-C1 Tyr), 127.81 (Ar-C4 Phe)*, 118.86 (Ar-C4 His), 116.25 (Ar-C3 y C5 Tyr), 61.31 (Cα Pro), 56.35

30 (Cα Tyr), 55.96 (Cα Phe), 53.41 (Cα Leu), 53.09 (Cα His), 48.75 (CH₂δ Pro)*, 47.31 (Cα

Ala)*, 41.53 (C α Gly), 40.63 (CH₂ Leu), 38.83 (CH₂ Phe), 38.27 (CH₂ Tyr), 32.01 (CH Val), 30.56 (CH₂ β Pro), 28.71 (CH₂ His)*, 25.98 (CH₂ γ Pro), 25.76 (CH Leu), 23.39 (CH₃ Leu), 21.63 (CH₃ Leu), 16.48 (CH₃ Ala). *No se observa en C RMN rutinario. Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; No se observan los grupos CO del esqueleto mediante C
 5 RMN de rutina; HRMS (ESI-TOF) m/z calculado para C₄₀H₅₄N₉O₉ [M+H]⁺: 804.4039. Encontrado [M+H]⁺: 804.4045 and [M+2/2]⁺: 402.7057.

Ejemplo 7. H-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Ala-His-OH (PEP6) (SEQ_ID: 6)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro
 10 de 2-clorotritilo (1.55 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (43 mg, 64%) con un 100% de pureza (214 nm); H RMN (500 MHz, CD₃OD): δ 8.71 (d, J = 1.2 Hz, 1H, Ar-H3 His), 7.37 (d, J = 0.7 Hz, 1H, Ar-H5 His), 7.31 – 7.17 (m, 5H, ArH Phe), 7.04 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.69 (d, J = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y H5 Tyr), 4.71 – 4.65 (m, 2H, H α Phe y His), 4.60 (dd, J = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H α Tyr), 4.41 (m, 2H, H α Pro y
 15 Val solapados), 4.24 (q, J = 7.1 Hz, 1H, H α Ala), 3.82-3.78 (m, 1H, CH₂ $\alpha\delta$ Pro), 3.70 – 3.65 (m, 1H, CH₂ $\beta\delta$ Pro solapado con CH₂ α Gly), 3.62 (dd, J = 16.5 Hz, 2H, CH₂ Gly), 3.32-3.29 (m, 1H, CH₂ α His, solapado con disolvente), 3.17 (dd, J = 15.3, 7.1 Hz, 1H, CH₂ β His), 3.10 (dd, J = 13.7, 7.5 Hz, 1H, CH₂ α Phe), 3.02 (dd, J = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH₂ α Tyr), 2.94 (dd, J = 14.1, 9.3 Hz, 1H CH₂ β Phe), 2.74 (dd, J = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH₂ β Tyr), 2.22 (dd, J = 16.9,
 20 9.9 Hz, 1H, CH₂ $\alpha\beta$ Pro), 2.10 – 2.01 (m, 3H, CH Val, CH₂ $\beta\beta$ y CH₂ $\alpha\gamma$ Pro solapados), 2.00 – 1.87 (m, 1H, CH₂ $\beta\gamma$ Pro), 1.39 (d, J = 7.2, 3H, CH₃ Ala), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.98 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 162.23 (CO TFA), 157.21 (Ar-C4 Tyr), 138.12 (Ar-C1 Tyr), 136.77 (Ar-C2 His), 131.35 (Ar-C5 His), 131.23 (Ar-C2 y C6 Phe), 130.42 (Ar-C3 y C5 Phe), 129.79 (Ar-C4 Phe), 128.99 (Ar-C1 Phe), 127.95 (Ar-C3 y
 25 C5 Tyr), 118.51 (Ar-C4 His), 114.73 (Ar-C2 y C6 Tyr), 61.41 (C α Pro), 57.64 (C α Val), 56.34 (C α Tyr), 55.71 (C α Phe), 54.22 (C α Leu), 53.09 (C α His), 50.23 (C α Ala), 47.96 (CH₂ δ Pro), 41.95 (C α Gly), 39.91 (CH₂ Phe), 38.29 (CH₂ Tyr), 32.01 (CH Val), 28.32 (CH₂ His)*, 30.54 (CH₂ β Pro), 25.94 (CH₂ γ Pro), 19.70 (CH₃ Val), 19.01 (CH₃ Val), 14.29 (CH₃ Ala). **No se observa en C RMN rutinario. Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; Grupos
 30 CO y CH₂ de His no se observan en C RMN de rutina.; HRMS (ESI-TOF) m/z calculado para C₃₉H₅₂N₉O₉ [M+H]⁺: 790.3883. Encontrado [M+H]⁺: 790.3875.

Ejemplo 8. H-Gly-Tyr-Phe-Val-Pro-Leu-Ala-OH (PEP7)

Como se describe en el método general de síntesis de péptidos, utilizando la resina cloruro de 2-clorotritilo (1.55 mmol/g), con HCTU como agente de acoplamiento, se obtuvo un sólido blanco (66 mg, 78%) con un 100% de pureza (214 nm); H NMR (500 MHz, CD₃OD): δ 7.27 – 7.21 (m, 5H, ArH Phe), 7.05 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H2 y H6 Tyr), 6.69 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Ar-H3 y H5 Tyr), 4.65 (tap, *J* = 14.1, 7.0 Hz, 1H, H α Phe), 4.60 (dd, *J* = 9.2, 5.3 Hz, 1H, H α Tyr), 4.43 (m, 2H, CH α Pro and Val), 4.36 (m, 2H, H α Leu y H α Ala, solapados), 3.77 (m, 1H, CH₂ α Pro), 3.70 – 3.65 (m, 1H, CH₂ β Pro solapado con CH₂ α Gly), 3.60 (dd, *J* = 16.5 Hz, 2H, CH₂ Gly), 3.11 (dd, *J* = 14.4, 8.0 Hz, 1H, CH₂ α Phe), 3.02 (dd, *J* = 14.1, 5.2 Hz, 1H, CH₂ α Tyr), 2.94 (dd, *J* = 13.8, 8.0 Hz, 1H CH₂ β Phe), 2.74 (dd, *J* = 14.1, 9.2 Hz, 1H, CH₂ α Tyr), 2.20 (dd, *J* = 12.1, 7.8 Hz, 1H, CH₂ α β Pro), 2.08 – 2.00 (m, 3H, CH Val, CH₂ β β Pro and CH₂ α γ Pro solapados), 1.96 – 1.93 (m, 1H, CH₂ β γ Pro), 1.75 (dd, *J* = 13.5, 7.4 Hz, 1H, CH Leu), 1.68 – 1.53 (m, 2H, CH₂ Leu), 1.41 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, CH₃ Ala), 1.00 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val), 0.97 (d, *J* = 6.6 Hz, 6H, 2 x CH₃ Leu), 0.93 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃ Val); C RMN (125 MHz, CD₃OD): δ 174.30 (CO), 174.14 (CO), 173.12 (CO), 172.80 (CO), 172.03 (CO), 167.00 (CO TFA), 157.42 (Ar-C4 Tyr), 138.13 (Ar-C1 Tyr), 131.23 (Ar-C2 y C6 Phe), 130.42 (Ar-C3 y C5 Phe), 129.39 (Ar-C4 Phe), 128.64 (Ar-C1 Phe), 127.80 (Ar-C3 y C5 Tyr), 116.26 (Ar-C2 y C6 Tyr), 61.40 (C α Pro), 57.76 (C α Val), 56.38 (C α Tyr), 55.84 (C α Phe), 53.19 (C α Leu), 50.11 (C α Ala)*, 48.76 (CH₂ δ Pro), 41.99 (C α Gly), 41.38 (CH₂ Leu), 38.81 (CH₂ Phe), 38.24 (CH₂ Tyr), 31.99 (CH Val), 30.54 (CH₂ β Pro), 25.95 (CH₂ γ Pro), 25.70 (CH Leu), 23.39 (CH₃ Leu), 22.05 (CH₃ Leu), 19.78 (CH₃ Val), 18.87 (CH₃ Val), 17.92 (CH₃ Ala). *No se observa en C RMN rutinario. Se asigna mediante experimentos gHMBC y gHSQC; Dos grupos CO no se observan en C RMN de rutina; HRMS (ESI-TOF) *m/z* calculado para C₃₉H₅₇N₇O₉ [M+H]⁺: 766.4134, [M+2/2]⁺: 383.7087. Encontrado [M+H]⁺: 766.4105 y [M+2/2]⁺: 383.709.

25

Ejemplo 9. Resonancia de plasmón de superficie (Figs. 1 a 6)

Para los experimentos SPR se utilizó un aparato Biacore X-100 (Biacore, GE Healthcare Life Sciences) a temperatura ambiente con tampón Tris como eluyente (50 mM Tris pH 7.5, 50 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ with 20 mM EDTA and 2% of DMSO). La ILK recombinante (59.92 kDa) se obtuvo de Randox Life Sciences. La proteína se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 (Biacore, GE) siguiendo el método estándar de acoplamiento de aminas. En el cribado se evalúan los compuestos a una concentración de 500 micromolar. Los resultados de este primer cribado se muestran en la Fig. 1. El compuesto PEP2 proporcionó la mayor respuesta, seguido de PEP4. Los resultados indican que los compuestos se unen a ILK. Sin

18

embargo, el número de unidades de respuesta no es indicativo de la afinidad con la que los compuestos se unen a la ILK.

Las medidas de afinidad se hicieron mediante una serie de concentraciones distintas inyectadas a concentraciones entre 0.22 y 75 micromolar en el chip sensor a un flujo de 90 $\mu\text{L}/\text{min}$ durante 1 minuto, seguido de un tiempo de disociación de 1 min. Después de la disociación, se hace un lavado extra con 50% DMSO. No se necesitó regeneración. Los datos de los sensogramas se referenciaron doblemente y se corrigieron para el disolvente utilizando el programa BIAevaluation X-100 (Biacore, GE Healthcare Life Sciences). Los resultados se muestran en las Figs. 2 a 5 y en la tabla 1. El compuesto PEP4 es el que tiene mayor afinidad por ILK con una constante de afinidad (K_D) de 2.1 μM . Los sensogramas de los compuestos PEP4 (Fig 4) y PEP5 (Fig. 5) indican que se disocian de la proteína de forma lenta (larga cola en los sensogramas) a diferencia de PEP1 (Fig. 2) y PEP2 (Fig. 3). Esto sugiere que los compuestos PEP4 y PEP5 pueden producir un efecto de larga duración debido al largo tiempo que se mantienen interaccionando con la ILK en el chip.

Tabla 1

Compuesto	Secuencia	K_D (μM)
PEP1	GYFVPLH	9990
PEP2	AYFVPLH	69
PEP4	GYAVPLH	2.1
PEP5	GYFAPLH	8.8

Para el experimento de competición se realizaron inyecciones de disoluciones que contienen una concentración fija de α -parvina y concentraciones crecientes del compuesto PEP4 (10 a 1000 micromolar). El sensograma de resultados se recoge en la Fig.6 donde la señal producida por la unión de α -parvina (100 nM) a la ILK inmobilizada en el chip, disminuye a medida que aumenta la concentración del péptido hasta llegar a una inhibición máxima (inhibidor 500 μM). Una concentración mayor de inhibidor (1 mM) no aumenta el desplazamiento de la unión de α -parvina a ILK. Así, este experimento confirma que la unión de α -parvina a ILK puede activarse por el péptido. Esto implica que, o bien el péptido se une a la superficie de ILK que interacciona con α -parvina, o bien se une a otro

sitio de ILK que provoque un cambio conformacional en ILK que afecta a la unión a alfa-parvina.

Ejemplo 10. Cultivo de células mesangiales humanas

5 Las células mesangiales humanas (CMH) se cultivaron siguiendo los procedimientos descritos en la bibliografía (Díez-Marqués, M.L. y col 1995). Se recogieron porciones de corteza renal sanas, de un riñón humano obtenido por nefrectomía por carcinoma renal. Se aislaron los glomérulos por procedimientos mecánicos y se trataron con colagenasa tipo IA (Sigma, St. Louis, MO, EEUU). Las CMH se mantuvieron en placas Petri de plástico con
10 medio RPMI 1640 (Lonza, Walkersville, M.D., EEUU), suplementado con un 10% de suero fetal bovino, L-glutamina (1mm), penicilina (0,66 µg/mL), estreptomina sulfato (60 µg/mL) (Gibco, Paisley, Reino Unido), y tamponado con HEPES y bicarbonato, a pH 7.4 en una atmósfera con 5% de CO₂. El medio de cultivo se cambió cada dos días. Para la realización de los ensayos, se sembraron CMH en placas de 6 pocillos y se trataron en medio sin FBS.

15

Ejemplo 11. Efecto de los compuestos sobre la polimerización de actina en CMH (Fig. 7)

Para evaluar el efecto de los compuestos sobre el citoesqueleto, se analizó la polimerización de actina en CMH mediante técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para
20 ello, las CMH fueron cultivadas sobre cubreobjetos circulares de cristal estériles (Microscope Cover Glass 12 mm; Thermo Scientific; Chicago, IL, EEUU), a una densidad de 100.000 células/pocillo, en medio con 10% FBS. Al día siguiente, las células se privaron de suero y se les añadió el tratamiento con los péptidos durante 1 hora y 24 horas. Finalizado el tiempo de tratamiento, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X y se fijaron con
25 paraformaldehído al 4% en PBS 1X durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, las células se lavaron 2 veces con PBS y se trataron los cubres durante 10 minutos con PBS/0,1% tritón X-100 a temperatura ambiente. Se lavaron 2 veces con PBS y se bloquearon los cubres durante 30 minutos con una solución de bloqueo (5% BSA) en PBS/0,1% tritón X-100 a temperatura ambiente. Los cubreobjetos fueron incubados con el
30 anticuerpo de faloidina (Sigma) diluido en PBS con 0,5% BSA:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se lavaron y se montaron con líquido de montaje ProLong® Gold antifade Reagent (Invitrogen Ltd, Paisley, Reino Unido) que incorpora tinción de núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol). Las muestras se observaron en microscopio confocal LEICA TCS-SP5 (Leica Microsystems; Wetzlar,

Alemania) utilizando láser de excitación a 560 nm para detectar el producto fluorescente, y el diodo de 405 nm para detectar el DAPI. Las imágenes fueron captadas y la intensidad de la fluorescencia se midió por densitometría con programa ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Los resultados para los compuestos PEP2 y PEP4 se representan en forma de porcentaje con respecto al control en la Fig. 7.

Referencias

- 10 Diez-Marques et al. (1995), Effects of somatostatin on cultured human mesangial cells, *Endocrinology*, 136(8):3444-51.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula I:
H-AA1- Tyr-AA3-Val-Pro-Leu-His-OH
5 donde:
 - AA1 y AA3 son Ala y Phe respectivamente, o
 - AA1 y AA3 son Gly y Ala respectivamente.

2. Compuesto definido en la reivindicación anterior para su uso en medicina.
10

3. Compuesto para su uso según la reivindicación anterior en el tratamiento de enfermedad renal crónica.

4. Composición farmacéutica que comprende el compuesto definido en la
15 reivindicación 1, para uso en el tratamiento de enfermedad renal crónica.

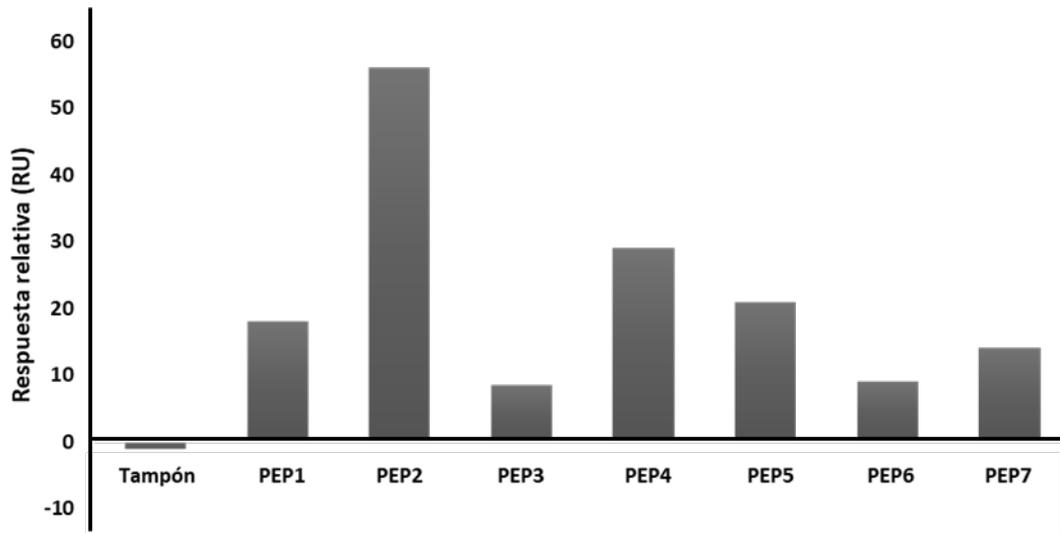


FIG. 1

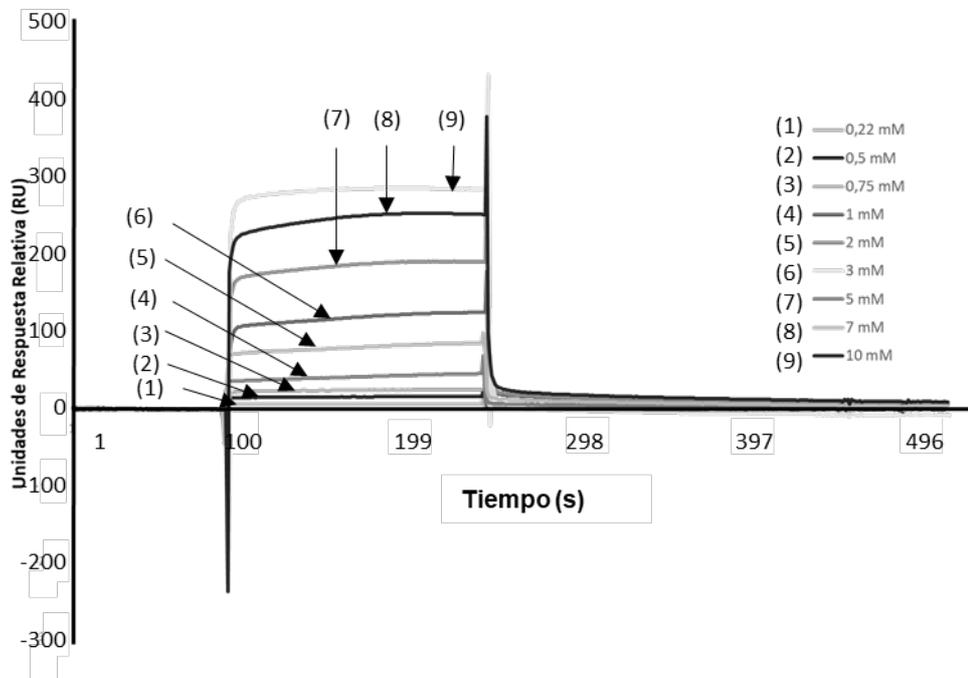


FIG. 2

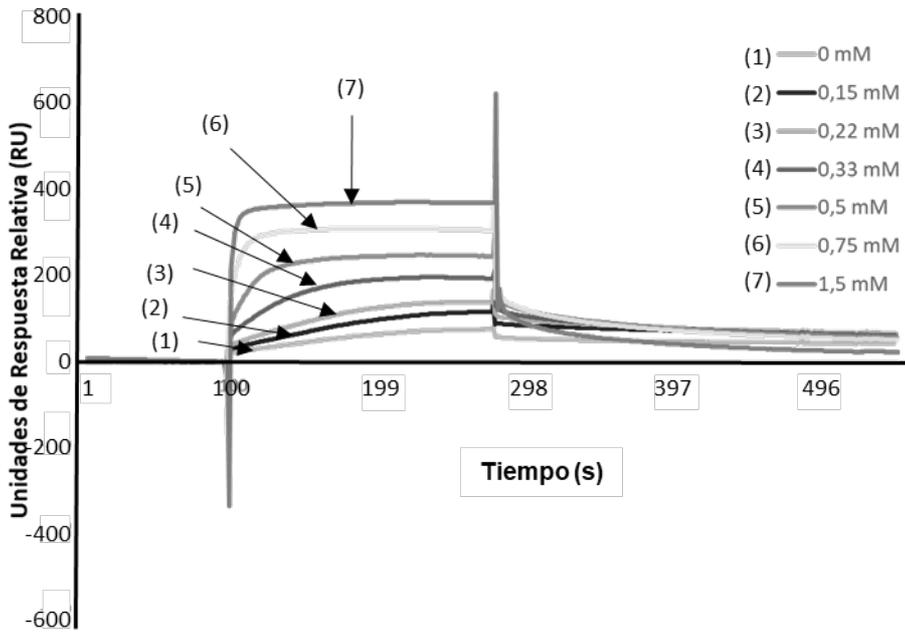


FIG. 3

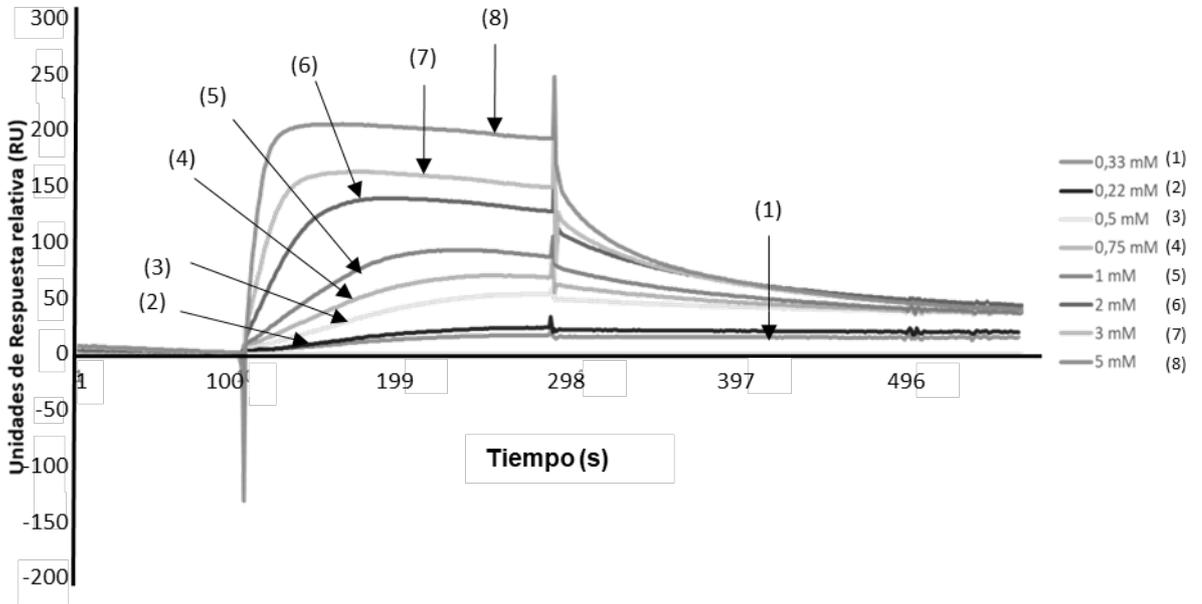


FIG. 4

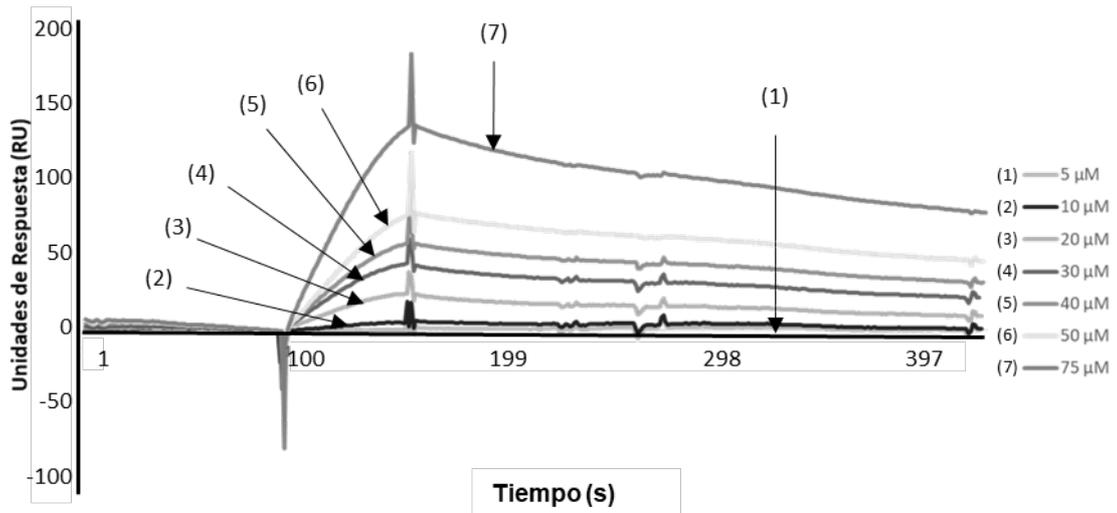


FIG. 5

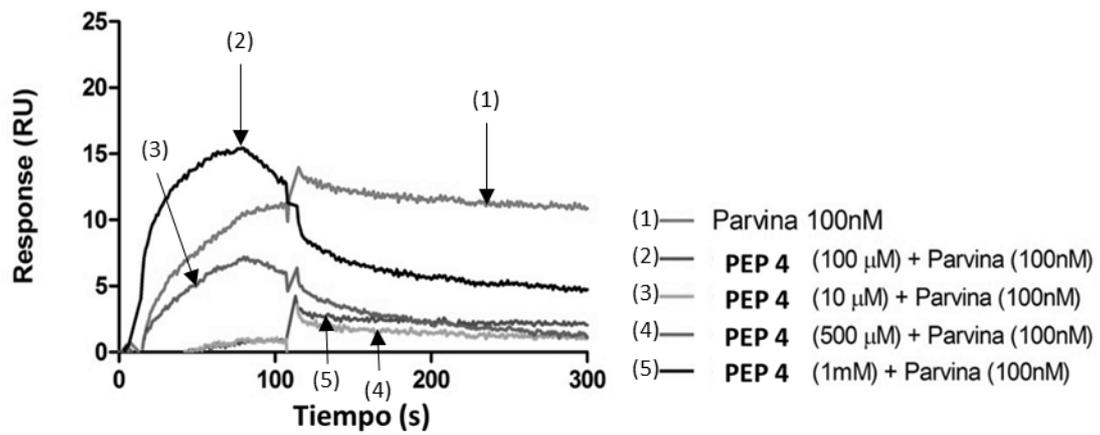


FIG. 6

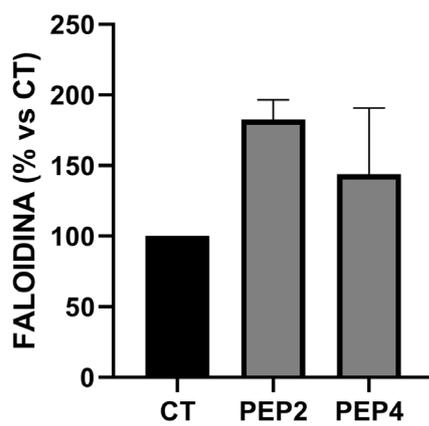
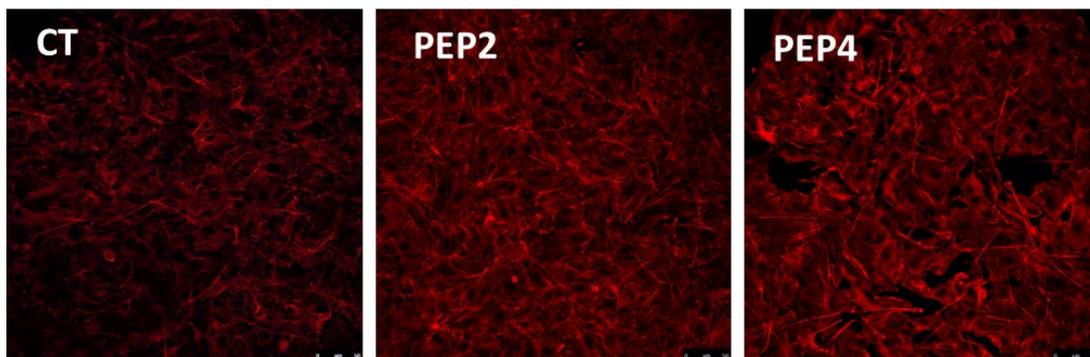


FIG. 7