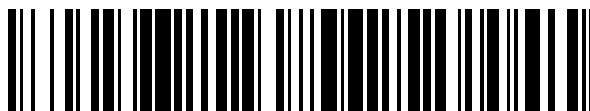


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 824**

51 Int. Cl.:
C07K 14/575 (2006.01)
A61K 38/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08758607 .9**
96 Fecha de presentación: **19.05.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2152741**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.02.2010**

54 Título: **PÉPTIDOS CON PROPIEDADES MEJORADAS QUE TIENEN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL PÉPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (PIV) Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES PULMONARES.**

30 Prioridad:
21.05.2007 EP 07010033

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.02.2012

73 Titular/es:
**RES INTERNATIONAL SARL
6 RUE GUILLAUME SCHNEIDER
2522 LUXEMBOURG, LU**

72 Inventor/es:
ROTH-CHIARELLO, Michael

74 Agente: **Illescas Taboada, Manuel**

ES 2 373 824 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos con propiedades mejoradas que tienen la actividad biológica del péptido intestinal vasoactivo (PIV) y su uso para el tratamiento de enfermedades pulmonares.

Campo de la invención

5 La presente invención hace referencia a unos nuevos péptidos que son biológica y farmacológicamente muy activos como agentes terapéuticos para el tratamiento de numerosas enfermedades pulmonares o enfermedades relacionadas con los pulmones y/o los bronquios, especialmente la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), la fibrosis quística (FQ) y la bronquiolitis obliterante (BO), así como la hipertensión pulmonar y arterial (HP, HA).

10 Los péptidos sintéticos de acuerdo con la invención son derivados/análogos sintéticos del péptido intestinal vasoactivo (PIV) y muestran propiedades físicas y biológicas/terapéuticas mejoradas comparados con el PIV nativo.

La presente invención también hace referencia a composiciones y formulaciones farmacéuticas que comprenden estos nuevos péptidos para su uso en enfermedades pulmonares como se ha especificado, preferiblemente por medio de su inhalación, incluyendo la inhalación a través de nanopartículas.

15 Estado de la técnica

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

EPOC es el término global para un grupo de enfermedades crónicas que están asociadas generalmente con la obstrucción de las vías respiratorias pulmonares. La enfermedad puede estar acompañada de hipertensión pulmonar (HP), aunque no necesariamente. El término EPOC hace referencia en concreto a los siguientes trastornos:

20 bronquitis crónica, bronquiectasia y enfisema.

La bronquitis crónica es una enfermedad inflamatoria que se inicia en las vías respiratorias más pequeñas dentro de los pulmones y avanza de forma gradual hacia vías respiratorias mayores. Incrementa la producción de mucosidades en las vías respiratorias e incrementa la incidencia de infecciones bacterianas en el árbol bronquial, lo que, a su vez, impide el flujo de aire. Esta inflamación crónica produce un adelgazamiento de las paredes del árbol bronquial conduciendo a un incremento de la congestión en los pulmones que resulta en disnea. Por definición, la bronquitis crónica hace referencia a la presencia de tos productiva durante al menos tres meses por año en dos años sucesivos para la cual se hayan descartado otras causas.

25

El enfisema describe la destrucción de la arquitectura pulmonar con un aumento de los espacios aéreos y pérdida de área de la superficie alveolar. El daño pulmonar está causado por el debilitamiento y rotura de los sacos aéreos dentro de los pulmones. Varios alveolos adyacentes pueden romperse, formando un gran espacio en lugar de muchos espacios pequeños. Los espacios más grandes pueden combinarse en una cavidad incluso mayor, denominada bulla. Como resultado, se pierde la elasticidad natural del tejido pulmonar, conduciendo al estrechamiento y la ruptura. Además, hay menos soporte en los tubos alveolares pequeños, lo que puede provocar su colapso y una obstrucción del flujo de aire. El aire que no se exhala antes de la nueva inhalación queda atrapado en los pulmones, provocando una dificultad para respirar. Puede ser agotador el gran esfuerzo que supone el sacar el aire de los pulmones al exhalar.

30

35

De esta forma, los síntomas más comunes de la EPOC incluyen dificultad para respirar, tos crónica, presión en el pecho, mayor esfuerzo para respirar, incremento de la producción de moco, y aclaramiento frecuente de la garganta. Los pacientes no son capaces de llevar a cabo sus actividades normales diarias. Es posible también un desarrollo independiente de bronquitis crónica y enfisema, pero la mayoría de los pacientes con EPOC tienen una combinación de trastornos. Ambas enfermedades reducen la capacidad de los pulmones para tomar oxígeno y eliminar el dióxido de carbono.

40

La causa más frecuente de EPOC es fumar a largo plazo, responsable del 80-90% de los casos. Otros factores de riesgo son la herencia, ser fumador pasivo, la polución del aire, y una historia de infecciones respiratorias frecuentes durante la niñez. Fumar e inhalar otros irritantes juega un papel fundamental en la patogénesis de la EPOC, que afecta hasta un 8% de la población de los países industrializados.

45

La respuesta inflamatoria en la EPOC implica cierto número de diferentes tipos celulares incluyendo células mononucleares (macrófagos), linfocitos T CD4+ y CD8+ o neutrófilos, que pueden aislarse de los pulmones de pacientes con EPOC. Cuando se activan, estas células inducen mediadores de la inflamación y citoquinas, como la interleucina (IL)-8, el factor de necrosis tumoral – A (TNF-alfa) o LTB4, que amplifican la respuesta inflamatoria y pueden remodelar la arquitectura pulmonar.

50

Además, hay una actividad excesiva de las proteasas, y un desequilibrio entre las proteasas y las antiproteasas endógenas. Parece que los corticosteroides no tienen ningún efecto sobre la inflamación en la EPOC, no habiendo cambios en la inflamación neutrofílica, ni reducción en los mediadores inflamatorios, ni en las proteasas. Hay un

efecto opuesto de los corticosteroides sobre los granulocitos, con una reducción en la supervivencia de eosinófilos, pero con una prolongación de la supervivencia de los neutrófilos. Esto es consistente con el fallo a largo plazo de los corticosteroides para modificar la progresión de la EPOC, e indica que se necesita desarrollar nuevos tipos de tratamientos antiinflamatorios en el futuro.

- 5 Las causas potenciales de la hipertensión pulmonar en la EPOC incluyen la destrucción enfisematosa del lecho capilar, el remodelado de los vasos pulmonares y la vasoconstricción pulmonar hipóxica. En las arterias pulmonares de los sujetos con EPOC, el engrosamiento de la capa íntima es el cambio morfológico más consistente producido por la proliferación de células de músculo liso y la deposición tanto de fibras elásticas como las de colágeno.

- 10 La hipoxemia es el factor principal que determina la disfunción endotelial que conduce a la vasoconstricción. Sin embargo, la disfunción endotelial y el engrosamiento íntimo pueden presentarse también en fumadores con EPOC leve que no son hipoxémicos, indicando que otros factores aparte de la hipoxemia pueden ser capaces de producir cambios vasculares en los fumadores. Las recientes observaciones de infiltrados de células inflamatorias, principalmente linfocitos T CD8+, en la adventicia de las arterias pulmonares de fumadores con EPOC respaldan el posible papel de estas células en la inducción de alteraciones endoteliales.

- 15 La EPOC es progresiva y algunas veces, irreversible; no existe actualmente ninguna cura. El desarrollo clínico de la EPOC se divide típicamente en tres fases, como se define en la Iniciativa Global para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (GOLD, por sus siglas en inglés):

GOLD 0: la función pulmonar es normal. En riesgo por síntomas crónicos (tos, esputo).

- 20 GOLD I Leve: $VEF1 / CVF < 70\%$, $VEF1 \geq 80\%$ del valor de referencia. Con o sin síntomas crónicos (tos, esputo).

GOLD II Moderada: $VEF1 / CVF < 70\%$, $50\% \leq VEF1 < 80\%$ del valor de referencia. Con o sin síntomas crónicos (tos, esputo).

GOLD III Grave: $VEF1 / CVF < 70\%$, $30\% \leq VEF1 < 50\%$ del valor de referencia. Con o sin síntomas crónicos (tos, esputo).

- 25 GOLD IV Muy Grave: $VEF1 / CVF < 70\%$, $VEF1 \leq 30\%$ del valor de referencia o $VEF1 < 50\%$ del valor de referencia con insuficiencia respiratoria crónica.

- 30 La prevalencia de la EPOC incrementa con la edad, pero hay una sinergia dramática con fumar, de manera que los fumadores tienen una mayor prevalencia y mortalidad por EPOC y mayor pérdida de la función pulmonar. Es 10 veces más probable que un fumador muera de EPOC que un no fumador. Cuando se inhala, el humo paraliza los pelillos microscópicos (cilios) que revisten el árbol bronquial. Los agentes irritantes e infecciosos atrapados en el moco permanecen en el árbol bronquial en lugar de ser arrastrados hacia fuera por los cilios. Esto puede inflamar las membranas bronquiales, resultando finalmente en una obstrucción crónica. Otros contaminantes internos o externos pueden dañar los pulmones y contribuir a la EPOC.

Aunque no hay ninguna cura para la EPOC, los medicamentos prescritos para los pacientes con EPOC incluyen:

- 35 Agonistas beta-2 de corta acción, como el salbutamol, que pueden ayudar a abrir las vías respiratorias;

Broncodilatadores anticolinérgicos, como el bromuro de ipratropio y los derivados de la teofilina, que ayudan a abrir las vías respiratorias;

Broncodilatadores de acción prolongada, que pueden ayudar a aliviar la constricción de las vías respiratorias y ayudan a prevenir el broncoespasmo asociado a EPOC;

- 40 Corticosteroides orales o inhalados, que pueden ayudar a reducir la inflamación;

Antibióticos, que se dan a menudo a la primera señal de infección respiratoria para prevenir daños mayores e infección en los pulmones enfermos;

Expectorantes, que ayudan a soltar y expulsar las secreciones mucosas de las vías respiratorias, y pueden a ayudar a hacer más fácil la respiración;

- 45 Trasplante de pulmón, que cada vez se lleva a cabo en un mayor número de ocasiones y que puede ser una opción para aquellos que sufren de enfisema grave;

Cirugía de reducción de volumen pulmonar, se muestra prometedora y cada vez se realiza con mayor frecuencia;

- 50 Tratamientos especiales para el enfisema con deficiencia en $\alpha 1$ -antitripsina (AAT), que incluye la terapia de reemplazo con AAT (proceso para toda la vida), están siendo evaluados.

Investigaciones actuales en el campo de la EPOC se están centrando en la terapia génica para sustituir la deficiencia en AAT.

Los desarrollos más novedosos describen el uso con éxito del péptido intestinal vasoactivo (PIV) y el polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria (PACAP) en el tratamiento de la EPOC (WO 03/61680).

5 Fibrosis quística (FQ)

La enfermedad crónica pulmonar es la principal causa de morbilidad y mortalidad en la FQ. La colonización bacteriana de las vías respiratorias ocurre generalmente durante el primer o segundo año desde su origen. Los pacientes con FQ tienen una predisposición a colonizaciones posteriores e infecciones con *Pseudomonas aeruginosa*, un organismo cuya presencia en los pulmones con FQ se asocia a un compromiso respiratorio progresivo. La infección está asociada con una respuesta inflamatoria excesiva dominada por los neutrófilos y los potentes mediadores inflamatorios que son liberados por los neutrófilos activados. Una reducción inexorable de la función pulmonar es la norma, conduciendo finalmente a la muerte o a la necesidad de trasplante pulmonar. Las investigaciones se centran en la función que tiene el gen CFTR en la FQ, en concreto, en la regulación del transporte de iones epiteliales, lo que ha proporcionado una convincente explicación de la patogénesis de la enfermedad gastrointestinal en la FQ, así como en la génesis de aquellos fenómenos asociados a la FQ como el alto contenido de cloruro sódico en el sudor. Sin embargo, el examen del transporte alterado de iones y agua por sí solo ha fallado para elucidar el camino desde el gen a la patogénesis en la FQ pulmonar, algo que ha dificultado los avances terapéuticos.

De hecho, es importante destacar que se cree que el fluido de la superficie de las vías respiratorias tiene concentraciones normales de cloruro y sodio en pacientes con FQ. Está también bajo sospecha otro dogma mantenido durante mucho tiempo sobre la patogénesis relacionada con la inflamación y la infección en la FQ. Se ha asumido que la eliminación inefectiva de las bacterias de las vías respiratorias en la FQ se debía principalmente a la patogénesis, lo que conducía de forma secundaria a la inflamación destructiva crónica de las vías respiratorias. Ahora parece posible que la causalidad de este enunciado ocurra al revés. Existe un consenso cada vez mayor sobre que las vías respiratorias en la FQ se caracterizan por una tendencia proinflamatoria anormal y exagerada que es anterior a la infección. Estudios *in vivo* que utilizan xenoinjertos de tráquea de fetos humanos sugieren convincentemente que esta predisposición proinflamatoria basal de las vías respiratorias en la FQ conduce al desarrollo de daños en la mucosa tras la infección, daño que es en sí mismo una parte integral de la posterior colonización bacteriana persistente de las vías respiratorias. La respuesta inflamatoria de las vías respiratorias en la FQ es persistentemente neutrofílica, caracterizada por la sobre-regulación de los mediadores quimiotácticos neutrofílicos como la interleucina 8 (IL-8) y el leucotrieno B4 (LTB4); excesiva acumulación de neutrófilos en las vías respiratorias; y activación neutrofílica, con liberación de productos tóxicos como la elastasa neutrofílica. La respuesta inflamatoria inicial a la mayoría de los estímulos bacterianos, en el pulmón o en cualquier otro lugar, es "aguda", esto es, dominada por neutrófilos. Sin embargo, al no haber eliminación bacteriana, normalmente hay una modulación en el tiempo a una menor histotoxicidad, inflamación "crónica", un cambio caracterizado por la presencia y actividad inmunorreguladora de las células monocíticas y los linfocitos. Una característica inusual de la inflamación en las vías respiratorias en la FQ es que esa modulación nunca tiene lugar.

Hipertensión arterial pulmonar, hipertensión pulmonar primaria e hipertensión pulmonar secundaria e hipertensión arterial

La hipertensión arterial pulmonar (HAP) es una enfermedad mortal que causa fallo cardiaco derecho progresivo en los tres años siguientes al diagnóstico. Recientemente, se han caracterizado varios cambios patofisiológicos asociados con este desorden, incluyendo la vasoconstricción, el remodelado vascular (es decir, proliferación de la capa media e íntima de los vasos de resistencia pulmonares), y trombosis *in situ*. La disfunción de la homeostasis vascular y endotelial se evidencia por una síntesis reducida de prostaciclina (PGI₂), una producción de tromboxano incrementada, una formación reducida de óxido nítrico y una síntesis aumentada de endotelina. Se ha detectado una elevación en la concentración intracelular de calcio libre en las células de músculo liso vascular (CMLV) de las arterias pulmonares en la HAP.

De forma comparable a la circulación pulmonar, las células endoteliales de la circulación sistémica liberan factores tanto de relajación como de contracción que modulan el tono del músculo liso vascular y también participan en la patofisiología de la hipertensión esencial. La vasodilatación dependiente del endotelio está regulada principalmente por el óxido nítrico, pero también por un factor hiperpolarizante no identificado derivado del endotelio y por la prostaciclina. Los factores de contracción derivados del endotelio incluyen la endotelina-I, los prostanoides vasoconstrictores, la angiotensina II y los aniones superóxido. En condiciones fisiológicas, hay una liberación equilibrada de factores de contracción y relajación. El equilibrio puede ser alterado en enfermedades cardiovasculares como la hipertensión, la aterosclerosis, la diabetes y otras enfermedades, contribuyendo de este modo a una mayor progresión del daño vascular y endo-orgánico. En concreto, la disfunción endotelial conduce a una reducción en la biodisponibilidad del óxido nítrico que afecta la vasodilatación dependiente de endotelio en pacientes con hipertensión arterial y puede ser también determinante para el desarrollo prematuro de aterosclerosis.

El tratamiento de la hipertensión pulmonar y arterial es insatisfactorio. El tratamiento actual incluye bloqueantes de los canales de calcio y prostaciclina. Nuevos avances describen la aplicación del péptido intestinal vasoactivo (PIV) y el polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria (PACAP) en el tratamiento de la HPP, HPS y de la hipertensión arterial (véase WO 02/43746).

5 Bronquiolitis obliterante (BO)

La bronquiolitis obliterante es una enfermedad inflamatoria crónica caracterizada por un proceso centrado en y alrededor de los bronquiolos membranosos y/o respiratorios con la conservación de una porción considerable de otras estructuras parenquimales.

La bronquiolitis obliterante es una enfermedad que limita el flujo del aire de forma no completamente reversible.

10 La limitación del flujo de aire normalmente es progresiva y está asociada con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones. El pronóstico es peor.

15 La bronquiolitis obliterante, el rechazo crónico seguido de un trasplante de pulmón, es un importante factor limitante de la supervivencia a largo plazo en los receptores del injerto pulmonar. Dado que este rechazo crónico responde mal a la inmunosupresión, el re-trasplante sigue siendo la última elección para los pacientes con enfermedad progresiva. Se conoce a partir de estudios clínicos y experimentales que la respuesta de los linfocitos T colaboradores Th1 y Th17 (del inglés, T-helper, Th) juega un papel crítico en la patogénesis de la BO. Así, las nuevas estrategias terapéuticas que están dirigidas específicamente frente a estas reacciones inmunológicas pueden ser prometedoras en el campo de la BO. El péptido intestinal vasoactivo (PIV) es una citoquina Th2 con propiedades antiinflamatorias, mientras que el Interferón (IFN)- γ es una citoquina Th1 con actividad antifibótica que
20 inhibe la producción de IL-17 por las células Th17. En el proyecto propuesto, el PIV y el IFN- γ se utilizarán como tratamiento único o combinado para prevenir el desarrollo de la BO en modelos experimentales de trasplante pulmonar ortotópico en rata. El objetivo de este estudio preclínico es determinar si el PIV o el IFN- γ son efectivos para la prevención/mejora de la BO en el modelo experimental, pudiéndose así introducir en ensayos clínicos. Además, el objetivo de este estudio es investigar los mecanismos de acción de los tratamientos propuestos, incluyendo el papel del PIV en la inducción de las células T reguladoras tras el trasplante y el papel del IFN- γ en la
25 inhibición de la inflamación provocada por IL-17.

Péptido Intestinal Vasoactivo (PIV):

El PIV es un péptido de 28 aminoácidos que se encuentra de forma natural en los humanos que consiste en la siguiente secuencia de aminoácidos (desde el extremo N- a C- terminal):

30 His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn

(SEQ ID NO: 1)

35 El péptido se sintetiza en varios componentes del sistema nervioso central, por ejemplo, regiones específicas del cerebro como el hipocampo y el córtex, así como en la glándula pituitaria y en los ganglios periféricos. El PIV se secreta además por células inmunes y por algunas células neoplásicas (por ejemplo, de cáncer de páncreas). Los individuos sanos presentan bajas concentraciones del PIV (<40 pg/ml de suero).

40 El PIV es una hormona peptídica ampliamente distribuida que participa en varias respuestas fisiológicas incluyendo la secreción gastrointestinal, la relajación del músculo liso gastrointestinal, vascular y respiratorio, la lipólisis en adipocitos, la secreción de la hormona pituitaria, y la excitación e hipertermia tras su inyección en el sistema nervioso central. En condiciones fisiológicas, el PIV actúa como un mediador neuroendocrino. Es importante destacar que el PIV es un potente agente antiinflamatorio, ya que el tratamiento con PIV reduce significativamente la incidencia y gravedad de la artritis en un modelo experimental, eliminando completamente la inflamación de las articulaciones y la destrucción de cartílago y hueso. El PIV puede provocar diferentes efectos biológicos y/o terapéuticos, algunos de los cuales están descritos en WO 9106565, EP 0536741, US 3, 880, 826, EP 0204447, EP
45 0405242, WO 9527496, EP 0463450, EP 0613904, EP 0663406, WO 9735561 y EP 0620008.

Se han detectado receptores del PIV en el epitelio de las vías respiratorias de la tráquea y los bronquiolos. También se expresa en los macrófagos que rodean los capilares, en el tejido conectivo de la tráquea y los bronquios, en las paredes alveolares y en la capa subíntima de las venas y arterias pulmonares.

50 Como se ha comentado, el PIV tiene un fuerte efecto broncorrelajante, vasorrelajante y antiinflamatorio. Por lo tanto, la inhalación del PIV (o de un análogo selectivo del receptor) es un enfoque prometedor para las enfermedades pulmonares. Aunque en principio el PIV se ha utilizado recientemente y de forma exitosa en ensayos clínicos para el tratamiento de la HPP, la EPOC y la FQ, desafortunadamente estos compuestos se acompañan de una degradación enzimática considerable en el tejido bronquial, especialmente cuando se administran por vía inhalatoria.

Por lo tanto, existe la necesidad de proporcionar péptidos que tengan esta actividad biológica del PIV, pero que presenten, sin embargo, propiedades mejoradas, especialmente relacionadas con una estabilidad y eficacia terapéutica mejoradas.

Resumen de la invención

- 5 Se ha demostrado que los nuevos péptidos sintéticos derivados de la estructura original del PIV nativo, son efectivos en los ensayos preclínicos *in vitro*.

La eficacia y efectividad biológica y terapéutica de los nuevos péptidos sintéticos es mayor si se compara con la eficacia y efectividad del PIV. Además, los nuevos péptidos muestran una mayor estabilidad en composiciones farmacéuticas, en su formulación y una vida media sérica mejorada en comparación con el PIV.

- 10 Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar estos nuevos compuestos, que pueden ser útiles para la prevención y/o el tratamiento de la EPOC, la FQ, la BO, la HAP, la HPS y otras enfermedades relacionadas con los pulmones/bronquios, y métodos terapéuticos, en los que se utilicen dichos compuestos.

Los nuevos péptidos de acuerdo con la invención se seleccionaron del grupo consistente en (aminoácidos 1-28 desde el extremo N- a C- terminal):

- 15 His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID NO: 2 (A-15))

His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 3 (A-18))

- 20 His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 4 (A-20))

Donde, His(Ac) (posición 1) significa N-acetil histidina, y Met(O) (posición 17) significa óxido de metionina. Los residuos de aminoácidos subrayados difieren de los correspondientes residuos de aminoácidos en la secuencia del PIV (SEQ ID NO: 1).

- 25 Sorprendentemente, dichos componentes son en su mayor parte claramente más efectivos y activos que el PIV o el PACAP bajo idénticas condiciones preclínicas / fisiológicas.

Los inventores podrían demostrar que la eficacia mejorada respecto al PIV puede lograrse reemplazando el residuo de histidina en la posición 1 con acetil histidina (His(ac)) y/o reemplazando el residuo de metionina (Met) en la posición 17 con óxido de metionina (Met(O)). Se prefiere la sustitución con His(Ac) y Met(O).

- 30 Además, los péptidos de acuerdo con la invención muestran propiedades antiinflamatorias (Fig. 5a,b; 6a,b; 8; 10a,b; 11a,b; 12a,b), antiproliferativas (Fig.13) broncodilatadoras y vasodilatadoras (Fig.4; 7; 9) mejoradas comparados con el PIV.

Por ejemplo, mediante la administración del péptido de SEQ ID NO: 2 (A-15) o SEQ ID NO: 4 (A-20) se puede mejorar la función pulmonar de un paciente en un 10-20% comparado con la administración del PIV (SEQ ID NO: 1) bajo las mismas condiciones en EPOC o FQ, en caso del péptido de SEQ ID NO: 3 en un 10-15%.

- 35 Sorprendentemente, dichos compuestos son generalmente estables bajo condiciones idénticas o comparables *in vivo* e *in vitro*, incrementando así la vida media sérica, y/o bajo condiciones *in vitro* comparado con el PIV o el PACAP. Los inventores podrían demostrar que la mejora en la estabilidad puede lograrse reemplazando el residuo de aminoácido nativo Ile en la posición 26 del PIV con Val o Ala, preferiblemente Val. Esta sustitución de aminoácido conduce a un incremento en la estabilidad, por ejemplo, en soluciones fisiológicas de alrededor del 100%. También la vida media sérica *in vivo* en un paciente puede mejorar si se compara con la administración del PIV entre el 20-100%, preferiblemente entre el 50-80%.

- 40 Además, podría demostrarse de acuerdo con los resultados de la invención que la degradación enzimática del PIV o del PACAP, que ocurre fácilmente en los pulmones y bronquios, puede mejorarse mediante los péptidos de acuerdo con la invención, donde la modificación del PIV que da lugar a dichos péptidos novedosos no daña las funciones biológicas de los péptidos obtenidos. Así, se prefiere que los péptidos novedosos sean adecuados para su inhalación. En un aspecto preferido de la invención, estos péptidos novedosos pueden administrarse al paciente de una manera más efectiva que el PIV mediante su inhalación por medio de nanoesferas o nanopartículas.

- 45 Dichos compuestos quizá son muy activos en pacientes que preferiblemente sufren de EPOC, FQ o BO, y también EPOC, que preferiblemente no vaya acompañada de hipertensión pulmonar (como la hipertensión pulmonar primaria o secundaria (HPP, HPS)).

- 50 Los péptidos sintéticos de acuerdo con la invención quizá son además adecuados para la profilaxis y tratamiento de la tos del fumador y otros síntomas similares.

Generalmente, la función pulmonar en un paciente que sufre alguna de las enfermedades pulmonares especificadas más arriba, preferiblemente, EPOC, FQ o BO, puede mejorar un 10-35%, preferiblemente 10-20%, más preferiblemente 15-25% y más preferiblemente 20-30% si se compara con el tratamiento con PIV en idénticas condiciones. Así, en enfermedades relacionadas con la EPOC, el valor de VEF1 puede incrementarse dependiendo de la etapa de la enfermedad un 10-50% comparado con el PIV. Puesto que el PIV por sí mismo puede mejorar el valor de VEF1 un 5-50% si se compara con pacientes con EPOC no tratados, es extraordinario el impacto favorable de los nuevos péptidos de acuerdo con la invención.

En resumen, un objetivo de esta invención es proporcionar los siguientes puntos:

- 10 • Un péptido sintético que tiene la actividad biológica del péptido intestinal vasoactivo (PIV), donde dicho péptido presenta propiedades mejoradas respecto al PIV, dicho péptido seleccionado del grupo que consiste en:
 - 15 (i) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID NO: 2),
 - (ii) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 3), y
 - (iii) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 4),

donde His(Ac) significa N-acetil histidina, y Met(O) significa óxido de metionina.
- 20 • Un péptido sintético análogo que comprende el péptido de SEQ ID NO: 2: His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn.
- Un péptido sintético análogo que comprende el péptido de SEQ ID NO: 3: His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn.
- 25 • Un péptido sintético análogo que comprende el péptido de SEQ ID NO: 4: His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn.
- Una composición farmacéutica que comprende un péptido sintético análogo de acuerdo a lo especificado, opcionalmente junto con un transportador, excipiente o diluyente aceptable.
- 30 • Una composición farmacéutica análoga, donde dicho péptido sintético está acoplado a una nanopartícula o nanoesfera, o está encapsulado por nanopartículas o nanoesferas.
- Una composición farmacéutica análoga, donde dicho péptido sintético está formulado como aerosol.
- Una composición farmacéutica análoga, donde dichos péptidos o polipéptidos están presentes en un rango de concentración entre 3 y 3000 mg/l, preferiblemente 10-500 mg/l.
- 35 • Uso de un péptido o una composición farmacéutica como se especifica para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad pulmonar o bronquial o una enfermedad relacionada con las enfermedades pulmonares o bronquiales.
- El uso análogo, donde dicha enfermedad es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
- 40 • El uso análogo, donde dicha EPOC no está asociada o no está farmacológicamente relacionada con enfermedades de hipertensión.
- El uso análogo, donde dicha enfermedad es la fibrosis quística (FQ).
- El uso análogo, donde dicha enfermedad es la bronquiolitis obliterante (BO).
- El uso análogo, donde la administración del péptido sintético o de la composición farmacéutica conduce a una mejora de la función pulmonar en el paciente del 20-30% en relación con la administración del PIV en las mismas condiciones.
- 45 • El uso análogo, donde la administración del péptido sintético o de la composición farmacéutica conduce a un incremento de la vida media sérica en el paciente en comparación con el PIV.
- El uso análogo, donde dicho péptido se suministra en los pulmones del paciente a través de su inhalación.

Breve descripción de las Figuras y Tablas:

50 **Tabla 1:** la tabla 1 muestra el diagrama del estudio clínico de Consort-E.

Tabla 2: la tabla 2 muestra las puntuaciones del resumen del componente físico (RCF) y las puntuaciones del resumen del componente mental (RCM). Las variables se calcularon como el cambio desde el inicio hasta el objetivo.

Tabla 3: la tabla 3 muestra los efectos adversos del estudio clínico.

55 **Tabla 4:** la tabla 4 muestra la función pulmonar del paciente con FQ durante y tras 3 meses de tratamiento con PIV.

Tabla 5: la tabla 5 muestra la producción nítrica por los monocitos tras la estimulación de LPS por SEQ ID NO: (PIV) y SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20).

Tabla 6: la tabla 6 muestra la producción de AMPc tras la estimulación con SEQ ID NO: 1 (PIV) (tabla 6a), SEQ ID NO: 2 (A-15) (tabla 6b) y SEQ ID NO: 3 (a-18) (tabla 6c).

Fig. 1: la figura 1 describe las concentraciones séricas de SEQ ID NO: 1 (PIV) en suero proveniente de sujetos normales y de pacientes con EPOC y cáncer pancreático.

5 **Fig. 2:** media del Volumen Espiratorio Forzado en un Segundo (VEF1) en Determinados Momentos (A). Los números en cada punto temporal se refieren a datos derivados de los grupos de tratamiento con PIV (■) o con placebo (○); los asteriscos indican $p < 0,01$ para la comparación con el placebo. El cambio medio en la Capacidad Vital Inspiratoria (B) si se compara con el Valor en la Aleatorización (Día 0) en el grupo del Placebo (○) o del PIV (■). Los asteriscos denotan $p < 0,01$ en comparación con el placebo.

10 **Fig. 3:** la figura 3 muestra el Cambio Medio en la Distancia Recorrida en Seis Minutos desde el inicio hasta el Día 90 en los grupos del PIV y placebo. $p < 0,01$ para la comparación entre el PIV y el placebo.

Fig. 4: la figura 4 muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15) en los experimentos *in vitro* con arteria pulmonar de rata.

15 **Fig. 5a:** la figura 5a muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-1 b en las células de músculo liso bronquiales (CMLB) *in vitro*.

Fig. 5b: la figura 5b muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-4 en las células de músculo liso bronquiales (CMLB) *in vitro*.

20 **Fig. 6a:** la figura 6a muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-6 en las células de músculo liso bronquiales (CMLB) *in vitro*.

25 **Fig. 6b:** la figura 6b muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-8 en las células de músculo liso bronquiales *in vitro*.

Fig. 7: la figura 7 muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 3 (A-18) en los experimentos *in vitro* con arteria pulmonar de rata.

30 **Fig. 8:** la figura 8 muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-10 en las células de músculo liso bronquiales *in vitro*.

Fig. 9: la figura 9 muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 4 (A-20) en los experimentos *in vitro* con arteria pulmonar de rata.

Fig. 10a: la figura 10a muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-4 en fibroblastos *in vitro*.

35 **Fig. 10b:** la figura 10b muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-6 en fibroblastos *in vitro*.

Fig. 11a: la figura 11a muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-8 en fibroblastos *in vitro*.

40 **Fig. 11b:** la figura 11b muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-10 en fibroblastos *in vitro*.

Fig. 12a: la figura 12a muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción del factor de necrosis tumoral (TNF)-a en fibroblastos *in vitro*.

45 **Fig. 12b:** la figura 12b muestra el efecto de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) sobre la producción de Interleucina(IL)-1 β en fibroblastos *in vitro*.

Fig. 13: la figura 13 muestra el efecto antiproliferativo de SEQ ID NO: 1 (PIV) comparado con el de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) en fibroblastos y células de músculo liso bronquiales.

Descripción Detallada de la Invención

50 El término “**misma actividad biológica**” significa la actividad o funcionalidad biológica, fisiológica o terapéutica comparada con las propiedades relevantes de dichos péptidos y polipéptidos, preferiblemente el PIV o el PACAP.

- El término “**derivado o análogo**” implica un compuesto peptídico que se deriva más o menos directamente del péptido correspondiente, como el PIV o el PACAP como tales, y que presenta algunas alteraciones como adiciones, deleciones, mutaciones o modificaciones que no afectan a las propiedades biológicas del péptido parental. Algunos derivados apropiados del PIV se describen, por ejemplo, en WO 8905857, WO 9106565, EP 0663406 y WO 9729126 (PIV protegido por Fmoc). El término incluye también conjugados de péptidos o polipéptidos según la invención que consisten en el péptido o polipéptido parental unido a entidades lipofílicas, como son los liposomas. Productos PIV – liposoma están descritos, por ejemplo, en WO 9527496 o WO 9735561, y tienen propiedades mejoradas en relación con la biodisponibilidad y la degradación proteolítica. Además, el término incluye también sus fragmentos, o los fragmentos ligeramente modificados incluyendo las formas truncadas.
- El término “**forma estable**” hace referencia a un derivado o un análogo de los péptidos según la invención, donde se ha alterado el péptido parental para obtener una mayor estabilidad e incrementar su vida media en sangre y suero. Se prefieren estas formas estables si el polipéptido es fragmentado mediante una actividad enzimática. Algunas formas estables posibles son los péptidos cíclicos, las proteínas de fusión, preferiblemente las proteínas de fusión-Fc o los péptidos pegilados, como por ejemplo el PIV pegilado u otros péptidos pegilados según la invención. La adición de polietilenglicol incrementa la estabilidad de los péptidos y polipéptidos de esta invención a pH fisiológico comparado con los compuestos no pegilados. Estos polipéptidos o proteínas pegilados son también estables en relación a las sales.
- El término “**proteína de fusión**” significa un compuesto, especialmente una forma estable, que consiste en un péptido según la invención, que se fusiona con otro péptido, polipéptido o proteína. Esta proteína es preferiblemente una molécula de inmunoglobulina, más preferiblemente un fragmento de la misma, más preferiblemente una porción Fc de una molécula de IgG, preferiblemente IgG1. En WO 200024278 se describe una proteína de fusión PIV-Fc que muestra una vida media mejorada tanto en suero como en sangre. Las fusiones Fc según la invención son el péptido SEQ ID NO: 2-Fc y el péptido SEQ ID NO: 3-Fc, y el péptido SEQ ID NO: 4-Fc, donde el péptido se fusiona preferiblemente al extremo C-terminal de la porción Fc de la inmunoglobulina.
- El término “**individuo o paciente**” se refiere preferiblemente a mamíferos, especialmente a humanos. El compuesto se utiliza en una formulación y composición farmacéutica, que comprenden, por lo general, un transportador farmacéuticamente aceptable, excipientes o diluyentes. Las técnicas para la formulación y administración de los compuestos de la presente invención pueden encontrarse en “*Remington's Pharmaceutical Sciences*”, Mack Publishing Co., Easton PA.
- El término “**péptido sintético**” hace referencia a los péptidos de la invención, que consisten en residuos de aminoácidos naturales o aminoácidos naturales modificados químicamente de forma parcial, y que se han producido bien completamente mediante síntesis química, o bien mediante métodos recombinantes en combinación con modificaciones químicas de residuos de aminoácidos individuales. En el caso de péptidos novedosos según la invención, que consisten en 28 residuos de aminoácidos, se prefiere una síntesis estándar de péptidos.
- Como se utiliza aquí, el término “**transportador farmacéuticamente aceptable**” significa un material inerte, no tóxico, sólido o líquido de relleno, diluyente o encapsulante, que no reaccione de forma adversa con el compuesto activo o con el paciente, o cualquier otra formulación como los comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, geles, jarabes, pastas, suspensiones y otros. Son conocidos en el estado de la técnica transportadores adecuados, preferiblemente líquidos, como agua estéril, suero salino, dextrosa acuosa, soluciones de azúcar, etanol, glicoles y aceites, incluyendo aquellos que provienen del petróleo o de origen animal, vegetal o sintético, como por ejemplo, el aceite de cacahuete, el aceite de soja y el aceite mineral. Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden administrarse como dosis unitarias que contienen transportadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables no tóxicos y de tipo convencional que son típicos para la administración parenteral.
- Las dosis unitarias según la invención pueden contener cantidades requeridas diariamente del compuesto de acuerdo con la invención, o sub-múltiplos de la misma hasta componer la dosis deseada. Para un paciente dado (mamíferos, incluyendo humanos), la dosis óptima terapéuticamente aceptable y la tasa de dosificación depende de varios factores, como la actividad específica del material activo empleado, la edad, el peso, el estado general de salud, el sexo, la dieta, el momento y la rutina de la administración, la tasa de aclaramiento, la actividad enzimática, el objetivo del tratamiento, es decir, tratamiento o profilaxis, y la naturaleza de la enfermedad a tratar. Por lo tanto, en composiciones o combinaciones en un paciente tratado (*in vivo*), la dosis diaria farmacéuticamente efectiva del péptido de esta invención se sitúa entre 5 ng y 200 µg/ kg de peso, preferiblemente entre 20 ng y 20 µg/ kg de peso.
- Según la invención, la administración preferida de los péptidos es la inhalación de soluciones acuosas que contengan un péptido de la invención. La solución acuosa es, preferiblemente, una solución salina isotónica (NaCl) que puede contener fármacos adicionales u otros ingredientes adecuados. Preferiblemente, se utilizarán los compuestos peptídicos que se utilicen en dichas soluciones en forma estable como se especificó anteriormente. Las soluciones especialmente preferidas son las soluciones isotónicas de NaCl que contienen el péptido en forma pegilada. La concentración del péptido utilizado en la terapia en dichas soluciones varía de acuerdo con la invención entre 10 mg y 300 mg/ l de solución, preferiblemente entre 30 mg y 100 mg/l. Si se utilizan formas estables, como las formas pegiladas de los péptidos de la invención especificados anteriormente, por lo general, puede reducirse la concentración, así como la dosis global del péptido seleccionado de la invención. Según la invención, la inhalación

de los péptidos puede llevarse a cabo, por lo general, de 1-4 veces al día durante 5-45 minutos, preferiblemente 10-20 minutos, según la gravedad de la enfermedad y la eficacia de los compuestos utilizados para el tratamiento.

De acuerdo con la invención, es preferible que la inhalación del compuesto se haga en forma de aerosol. Los aerosoles y las técnicas para fabricarlos se conocen bien en el estado de la técnica. En el caso de la EPOC, se prefiere especialmente a los aerosoles que se pueden aplicar mediante inhaladores que contienen el péptido de la invención. También es adecuada la administración mediante técnicas de espray nasal.

La administración de los péptidos sintéticos de acuerdo con la invención puede hacerse también con nanopartículas o nanoesferas a las que se unen o se acoplan los péptidos de la invención de forma química o mediante fuerzas de van der Waals, o en las que dichos péptidos están encapsulados. Las nanopartículas o nanoesferas son partículas generalmente esféricas derivadas de compuestos naturales o sintéticas, con un diámetro < 1000 nm, preferiblemente <500 nm, más preferiblemente < 200 nm. El transporte de los péptidos a las células diana puede verse mejorado por la liberación de nanoesferas inhaladas que comprendan un péptido según la invención: es menos probable que el péptido llegue a degradarse tras su administración en bolo mientras que todos los receptores celulares están completamente bloqueados, y el péptido es protegido por las nanoesferas, que se han producido usando otros sustratos enzimáticos que, como se mencionó más arriba, inhiben de forma competitiva la degradación enzimática del péptido terapéutico. De acuerdo con la invención, se pueden utilizar nanoesferas como transportadores para llevar los péptidos muy profundamente al interior de los pulmones mediante la inhalación, por ejemplo, por nebulización ultrasónica, que produce un tamaño de gota de aproximadamente 1-5, preferiblemente 3 µm. Por lo tanto, cada microgota transporta muchas nanoesferas cargadas con péptido terapéutico y nuevo de acuerdo con la invención. Se conocen bien en el estado de la técnica nanoesferas adecuadas para esto, como por ejemplo las lipo-partículas (liposomas), la protamina (ya conocida por la terapia con insulina depot), el ácido poli (D,L láctico co-glicólico) (PLGA), el Tiolato u otros sustratos poliméricos transportadores. Para una revisión completa de posibles nanopartículas adecuadas para los sistemas de transporte de fármacos, que pueden aplicarse en la actual invención, puede acudirse, por ejemplo, a J Pharm Pharmaceut Sci, 2000, 3(2), 234-258.

Se pueden administrar dosis terapéuticamente efectivas de los péptidos según la invención o sus composiciones farmacéuticas solas o como tratamiento coadyuvante en combinación con otros compuestos farmacéuticamente efectivos, como compuestos con otros fármacos, por ejemplo agonistas beta-2 de acción rápida (como el albuterol), broncodilatadores anticolinérgicos (como el bromuro de ipratropio), los corticosteroides inhalados u orales, antibióticos, o compuestos antiproliferativos, por ejemplo, D-24851, mesilato de imatinib, guanilhidrazona CNI-1493.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: PIV y EPOC: ensayo clínico fase II, doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo

La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) se caracteriza por una limitación progresiva del flujo de aire asociada con una inflamación crónica. El péptido intestinal vasoactivo (PIV) es un potente agente broncodilatador, vasodilatador y antiinflamatorio. Se evaluaron la eficacia y seguridad del PIV en pacientes con EPOC moderada a grave.

Se llevó a cabo el presente estudio doble ciego, aleatorizado, controlado por placebo en un grupo de pacientes ambulatorios. Se asignó de forma aleatoria a los pacientes con EPOC (n=34) bien al grupo de PIV (n=17) o bien placebo (n=17), administrado por inhalación, 4 veces al día durante 12 semanas. Se midieron las concentraciones séricas de PIV en todos los pacientes. Los objetivos primarios fueron la calidad de vida relacionada con la salud y la capacidad de hacer ejercicio. Los objetivos secundarios incluyeron los parámetros de función pulmonar y exacerbaciones de la EPOC.

En la EPOC, las concentraciones séricas del PIV fueron menores comparadas con los controles (Figura 1). Treinta (88%) pacientes completaron el estudio (Tabla 1). El volumen espiratorio forzado en 1 segundo post-broncodilatador mejoró significativamente con el PIV en 0.107 l y la capacidad vital (CVI) en 0.160 l comparado con el placebo (p<0.01) (Figura 2). Según el cuestionario corto de 36 preguntas (SF-36) desarrollado para su uso en estudios clínicos, la mejora en la calidad de vida fue mayor con el PIV (4.08) que con el placebo (0.20) (Tabla 2). De forma similar, los resultados con la escala de disnea de Borg fueron mejores con el PIV (- 0.20 unidades en reposo y - 1.07 tras hacer ejercicio) que con el placebo (0.21 unidades en reposo y 0.43 unidades tras hacer ejercicio) (Figura 3); la capacidad de hacer ejercicio incrementó en 32.7 m en el grupo del PIV (p<0.01) comparado con el grupo placebo (-8.6m) utilizando la prueba de la distancia recorrida en seis minutos (Figura 4). Se observaron diez exacerbaciones con el placebo y sólo 8 con el PIV (Tabla 3).

El PIV es un fármaco seguro y efectivo para el tratamiento de la EPOC, reduce las exacerbaciones, mejora la función pulmonar y la calidad de vida relacionada con la salud. Sin embargo, son necesarios estudios a largo plazo para evaluar completamente su eficacia en la EPOC.

Ejemplo 2: PIV y Fibrosis Quística

La respuesta inflamatoria de las vías respiratorias en la FQ es persistentemente neutrofílica, marcada por la sobre-regulación de los mediadores quimiotácticos de neutrófilos como la interleucina 8 (IL-8) y el leucotrieno B4 (LTB4); la

excesiva acumulación de neutrófilos en las vías respiratorias; y activación neutrofílica, con liberación de productos tóxicos como la elastasa neutrofílica. La respuesta inflamatoria inicial a la mayoría de los estímulos bacterianos, en el pulmón o en cualquier otro lugar, es “aguda”, esto es, dominada por neutrófilos como la inflamación por la EPOC. Se trató a dos pacientes con FQ con 200µg de PIV diarios, por inhalación y se midió su función pulmonar durante y tras 3 meses de tratamiento con el PIV. El volumen espiratorio forzado en 1 segundo (VEF1) post-broncodilatador y la capacidad vital (CV) mejoraron significativamente con el tratamiento durante 3 meses con el PIV (Tabla 4).

Ejemplo 3: Potencial terapéutico del PIV y de los péptidos según la invención

La combinación de bajos niveles séricos de PIV en pacientes con EPOC, la sobre-regulación del receptor del PIV en los pacientes con bronquitis crónica, los efectos pleiotrópicos antiinflamatorios del PIV, la posibilidad de administración local y la ausencia de efectos adversos locales y sistémicos en nuestro ensayo, hacen del PIV un candidato prometedor para el tratamiento de la EPOC y la FQ.

Además, los inventores sintetizaron los péptidos sintéticos según la invención, preferiblemente los péptidos de SEQ ID NO: 2 (A-15), SEQ ID NO: 3 (A-18) y SEQ ID NO: 4 (A-20) con una estructura nueva y los compararon con las propiedades antiinflamatorias y vasodilatadoras del PIV *in vitro* mediante los métodos descritos en los siguientes ejemplos. La síntesis de los péptidos según la invención se llevó a cabo mediante métodos estándar bien conocidos.

Ejemplo 4: Generación de Macrófagos *in vitro*

Se aislaron células mononucleares de sangre periférica a partir de sangre venosa obtenida de 12 pacientes con EPOC estable y de 12 pacientes sanos mediante centrifugación en gradiente de densidad Ficoll. Se diferenciaron los monocitos en medio RPMI-1640 suplementado con 5% de FCS, antibióticos y 10⁻⁸ M de 1,25-dihidroxicolecalciferol (Sigma) en atmósfera humidificada con un 5% de CO₂ a 37°C.

Ejemplo 5: Incubación LPS *in vitro*

Para la simulación de infección, estimulación de macrófagos y tratamiento experimental *in vivo*, se incubaron las células diferenciadas bien con LPS, con LPS y SEQ ID NO: 2 (A-15) o SEQ ID NO: 3 (A-18), o sólo con medio como control.

Ejemplo 6: Determinación de la secreción de óxido nítrico (ON)

Para evaluar la hipótesis de si los macrófagos utilizan o no la ruta de transmisión de señales del PIV para modular y limitar la respuesta inmune, se estimuló la reacción de inflamación *in vitro* y se midió la producción de ON (producido por iNOS) por las células bajo las circunstancias de inflamación y bajo el tratamiento con el PIV y los péptidos según la invención (SEQ ID NO: 2 y 3). La NOS incrementó dramáticamente mediante LPS tras 24 horas. La incubación simultánea de LPS con el PIV y los péptidos según la invención reveló una marcada respuesta antiinflamatoria encontrada tras 24 horas (Tabla 5). Esta respuesta antiinflamatoria fue mejor con los dos análogos del PIV de SEQ ID NO: 2 y 3.

Ejemplo 7: medición de AMPc

Los efectos del PIV y los péptidos según la invención están mediados por receptores específicos acoplados a proteínas G. Se han clonado tres subtipos distintos de receptor, con diferentes afinidades por los péptidos, y se han caracterizado como los receptores 1 y 2 (VPAC1 y VPAC2) y como el receptor del polipéptido activador de la adenilil ciclasa de pituitaria (PAC1). El mensajero secundario es el adenosin monofosfato cíclico (AMPc)

Se comparó la capacidad del PIV y de los péptidos según la invención (SEQ ID NO: 2 y 3) sobre la regulación del AMPc mediante los siguientes métodos:

Se sembraron células derivadas de arteria pulmonar (PASM) en 24 pocillos y se cultivaron en DMEM que contenía un 10% de suero fetal bovino (Gibco lifesciences, Karlsruhe), Penicilina (Gibco lifesciences, Karlsruhe, 100 U/ml), Estreptomocina (Gibco lifesciences, Karlsruhe, 100 U/ml) hasta confluencia. Tras la privación del suero durante 3 horas, las células se incubaron con el PIV o los péptidos según la invención con o sin 3-isobutil-1-metilxantina durante 20 minutos, que ha demostrado ser el tiempo óptimo de incubación para el análisis de la producción de AMP cíclico.

Se detuvo la incubación mediante el lavado de las células con PBS e, inmediatamente, se lisaron las células con HCl (0.1N) que contenía 3-isobutil-1-metilxantina (500 µM) para bloquear una mayor hidrólisis del AMPc.

Se centrifugaron las células lisadas y se analizaron los sobrenadantes en busca de AMPc utilizando el método comercialmente disponible ELISA AMP cíclico (Assay Designs, Inc., Michigan, distribuido por Bio Trend, Köln). El PIV incrementa el contenido de AMP cíclico en las PASM. El mayor incremento se observó tras la estimulación con los péptidos nuevos de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 2 y 3) (Tabla 6a, 6b y 6c)

Ejemplo 8: Ensayos ELISA y medición de IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL1-b y TNF-a en fibroblastos y en células de músculo liso bronquiales tras estimulación con FCS *in vitro*

Se llevaron a cabo los ensayos ELISA para IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL1-b y TNF-a según las instrucciones del fabricante (BD-PharMingen). En cada experimento se fijó la secreción de citoquina bajo la estimulación con FCS en un 100% para cada célula donante y experimento. Todo el resto de resultados se expresó de forma relativa a ese 100%. Para los análisis estadísticos se utilizó la prueba de la t de Student por pares de grupos, o la prueba de los signos de Wilcoxon.

5

Tabla 1. Diagrama de Consort E para el estudio clínico.

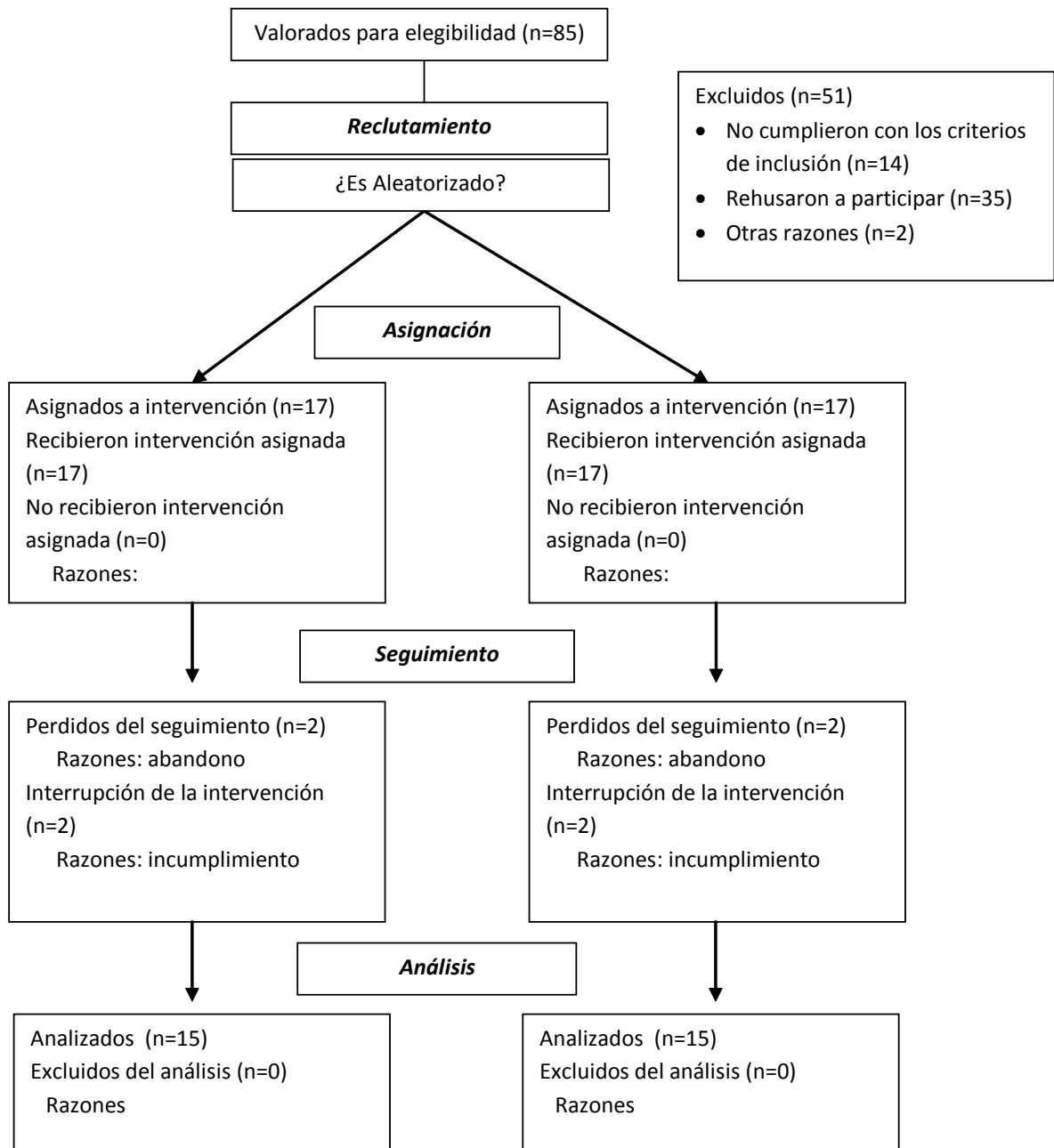


Tabla 2. Calidad de vida según el cuestionario corto de 36 preguntas - SF-36

SF-36	PIV	Placebo
RCF al inicio del tratamiento	41.15±2.26	38.62±2.12
RCF tras el tratamiento	45.23±2.07	38.82±2.49
RCM al inicio del tratamiento	44.45±2.41	44.89±2.53
RCM tras el tratamiento	47.92±2.18	45.64±3.18

Tabla 3. Efectos adversos

	Placebo (n=15)	PIV (n=15)
Exacerbación de la EPOC	10 (66.7%)	8 (53.3%)
Nasofaringitis	1 (6.7%)	0 (0%)
Diarrea no infecciosa	1 (6.7%)	0 (0%)
Infección del tracto respiratorio superior	1 (6.7%)	1 (6.7%)
Náuseas	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 4. Función pulmonar de paciente con FQ durante y después del tratamiento

Paciente: D.G., 19 J., F., FQ							
	CPT	CV	VEF1	VEF1/CV	VR	PaO2	PaCO2
Medición 1	5.54	2.21	0.95	43			
Medición 2	5.40	2.27	1.10	48			

5

Tabla 5. Producción nítrica por los monocitos tras la estimulación de LPS por PIV y análogos del PIV

	1	2	3	4	5
LPS 100 [nM]	-	+	+	+	+
PIV 100 [nM]	-	-	+	-	-
Pep -15 100 [nM]	-	-	-	+	-
Pep- 18 100 [nM]	-	-	-	-	+
Nítrico [µmol] +/- SD	48 +/-7	75 +/-18	31 +/-9	16 +/-8	19+/- 7

Tabla 6a. AMPc en PASMC tras estimulación con PIV durante 20 minutos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PIV [nM]	-	-	1	10	100	1	10	100	-
IBMX 500 μ M	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Forskolin 10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AMPc [pmol/ml]	2,70+/-	16,37	11,18	13,80	19,50	20,11	23,52	27,78	41,10
+/- SD	2,40	+/- 7,21	+/- 9,17	+/- 8,08	+/- 7,14	+/- 10,01	+/- 12,15	+/- 10,45	+/- 14,31

Tabla 6b. AMPc en PASMC tras estimulación con Pep 15 durante 20 minutos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pep - 15 [nM]	-	-	1	10	100	1	10	100	-
IBMX 500 μ M	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Forskolin 10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AMPc [pmol/ml]	3,4 +/-	17,16	13,30	16,30	23,30+/-	26,45	27,00	36,67	47,81
+/- SD	1,25	+/- 6,92	+/- 7,18	+/- 10,10	11,14	+/- 11,06	+/- 12,10	+/- 12,18	+/- 14,81

5 **Tabla 6c.** AMPc en PASMC tras estimulación con Pep 18 durante 20 minutos

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Pep - 18 [nM]	-	-	1	10	100	1	10	100	-
IBMX 500 μ M	-	+	-	-	-	+	+	+	+
Forskolin 10 μ M	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AMPc [pmol/ml]	2,2 +/-	15,91+/-	14,83+/-	19,45	28,43	36,66	37,00	46,42	58,00
+/- SD	2,4	5,72	7,52	+/- 10,11	+/- 7,19	+/- 13,42	+/- 12,11	+/- 10,0	+/- 14,13

REIVINDICACIONES

1. Péptido sintético que tiene la actividad biológica del péptido intestinal vasoactivo (PIV), donde dicho péptido presenta propiedades farmacológicas y/o físicas mejoradas respecto al PIV, dicho péptido seleccionado del grupo que consiste en:

- 5 (i) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID NO: 2),
 (ii) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 3), y
 10 (iii) His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn (SEQ ID NO: 4),

donde His(Ac) significa N-acetil histidina, y Met(O) significa óxido de metionina.

2. Péptido sintético según la reivindicación 1 que comprende el péptido de SEQ ID NO: 2:

His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn.

15 3. Péptido sintético según la reivindicación 1 que comprende el péptido de SEQ ID NO: 3:

His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn.

4. Péptido sintético según la reivindicación 1 que comprende el péptido de SEQ ID NO: 4:

20 His(Ac)-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met(O)-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Val-Leu-Asn.

5. Péptido sintético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dicho péptido sintético está acoplado a una nanopartícula o nanoesfera, o está encapsulado en una nanopartícula o nanoesfera.

25 6. Composición farmacéutica que comprende al menos uno de los péptidos sintéticos según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 5, opcionalmente junto con un transportador, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, donde el péptido sintético está formulado como aerosol.

8. Péptido sintético según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 6 ó 7 para ser usado en el tratamiento de enfermedades pulmonares o bronquiales o enfermedades relacionadas con enfermedades pulmonares o bronquiales.

30 9. Uso de un péptido o una composición farmacéutica como se especifica en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un paciente que sufre una enfermedad pulmonar o bronquial o una enfermedad relacionada con las enfermedades pulmonares o bronquiales.

10. Uso según la reivindicación 9, donde dicha enfermedad es la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

35 11. Uso según la reivindicación 10, donde dicha EPOC no está funcionalmente asociada o no está farmacológicamente relacionada con enfermedades de hipertensión.

12. Uso según la reivindicación 9, donde dicha enfermedad es la fibrosis quística (FQ) o la bronquiolitis obliterante (BO).

40 13. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 12, donde la administración del péptido sintético o de dicha composición farmacéutica conduce a una mejora de la función pulmonar en el paciente del 20-30% en relación con la administración del PIV en condiciones equiparables.

14. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 13, donde la administración del péptido sintético o de dicha composición farmacéutica conduce a un incremento de la vida media sérica en el paciente en comparación con el PIV.

45 15. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 14, donde dicho péptido o dicha composición farmacéutica está formulada para su inhalación en los pulmones.

Figura 1

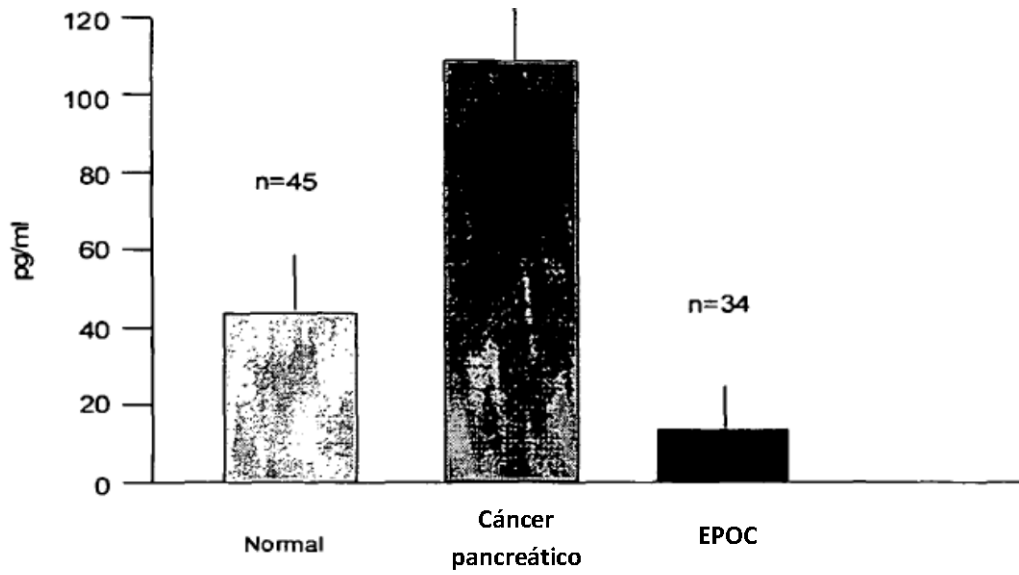


Figura 2

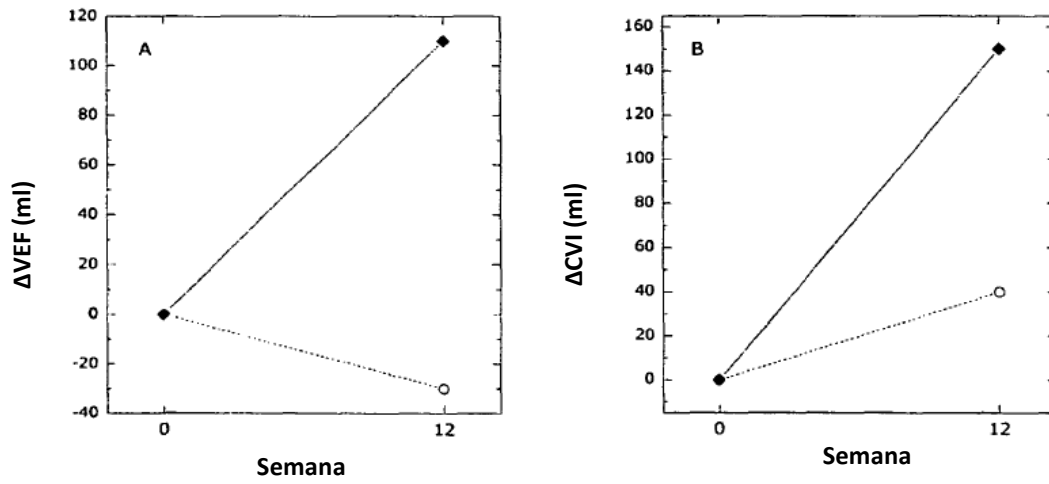


Figura 3

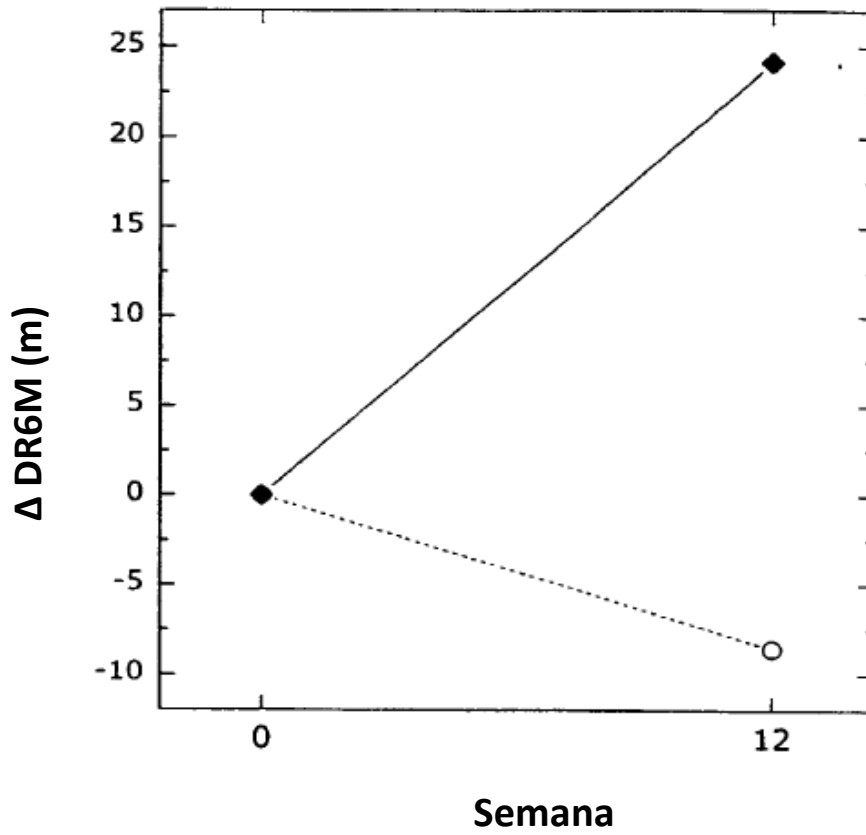


Figura 4

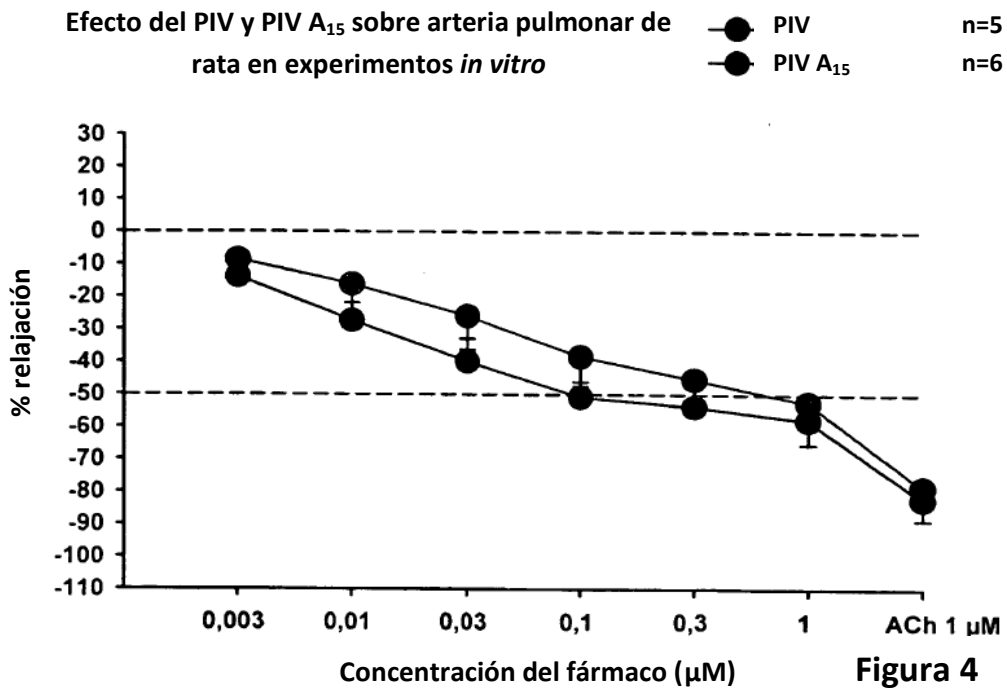


Figura 5a

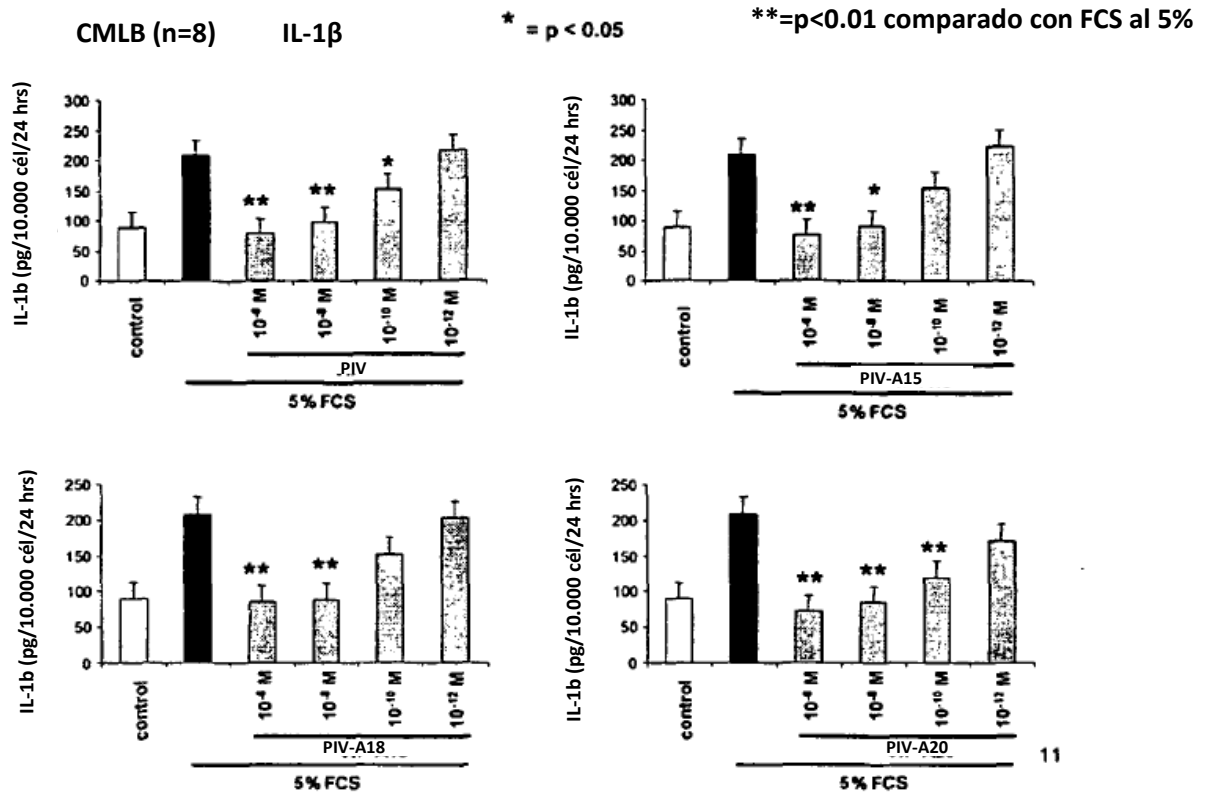


Figura 5b

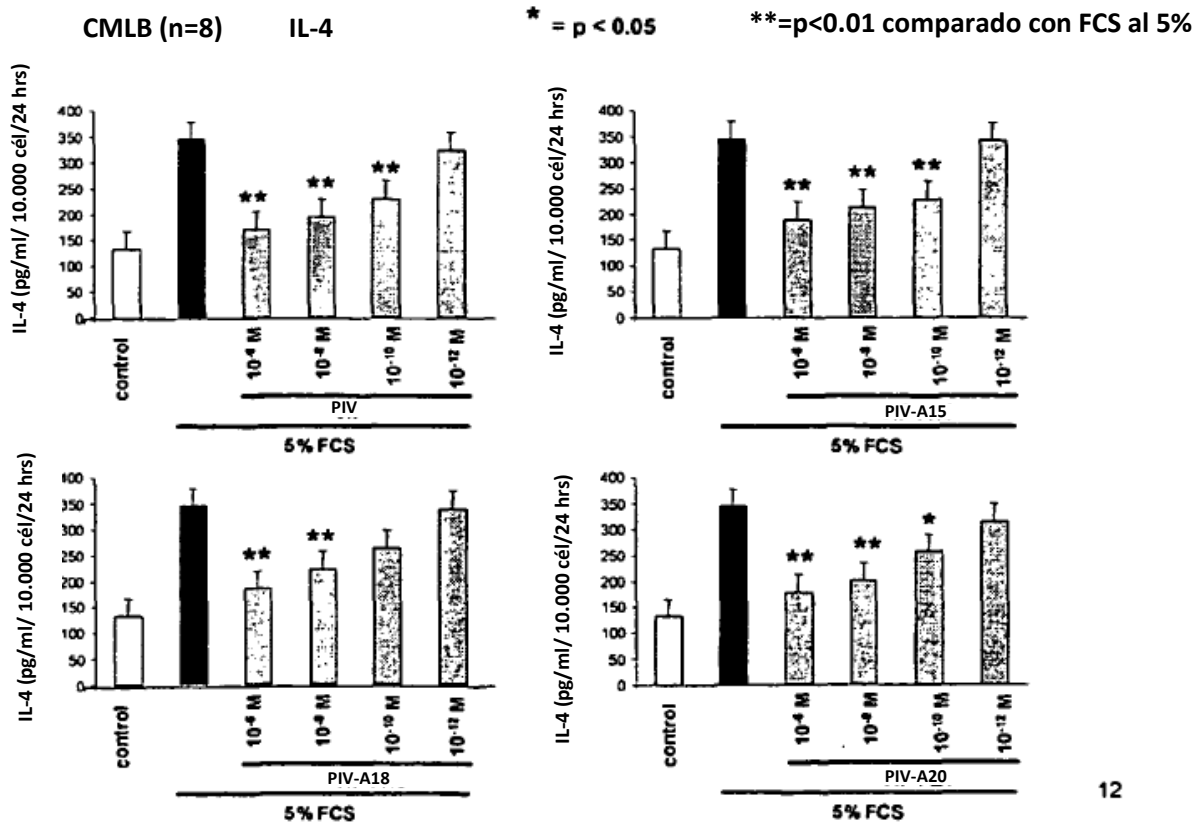
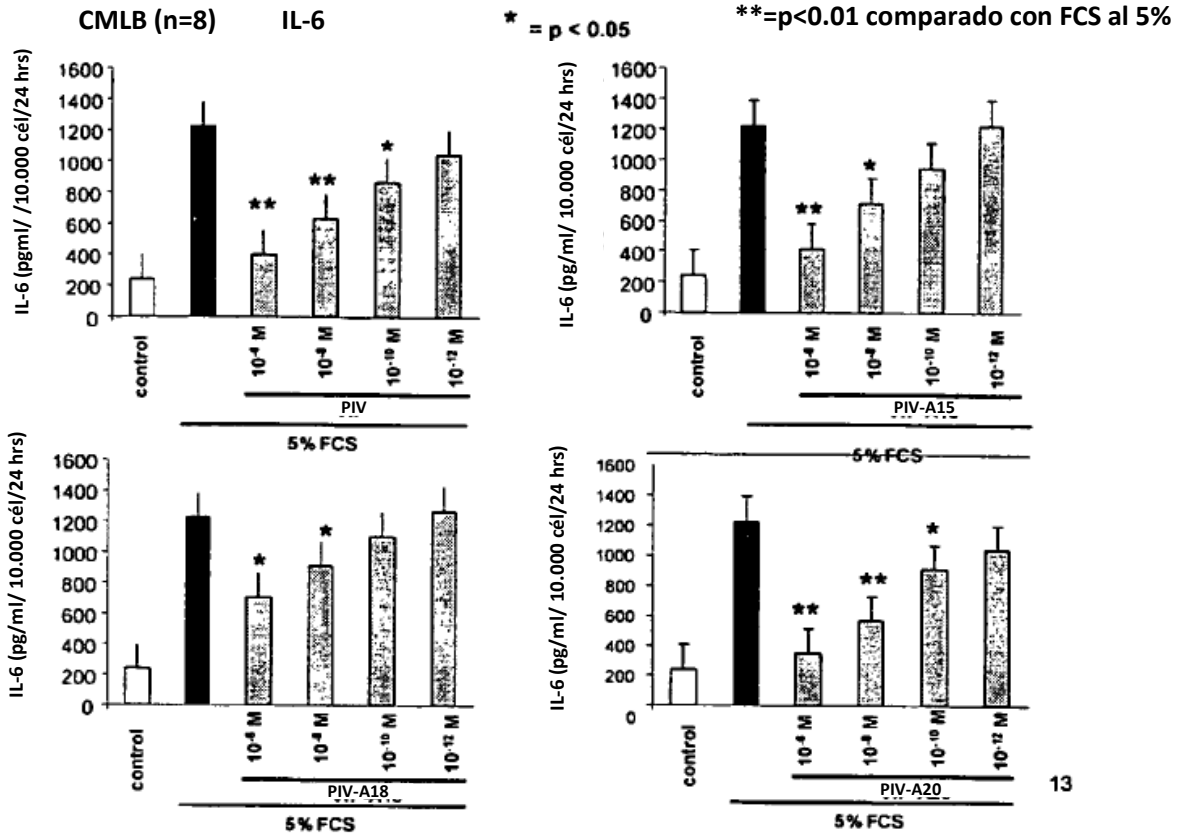
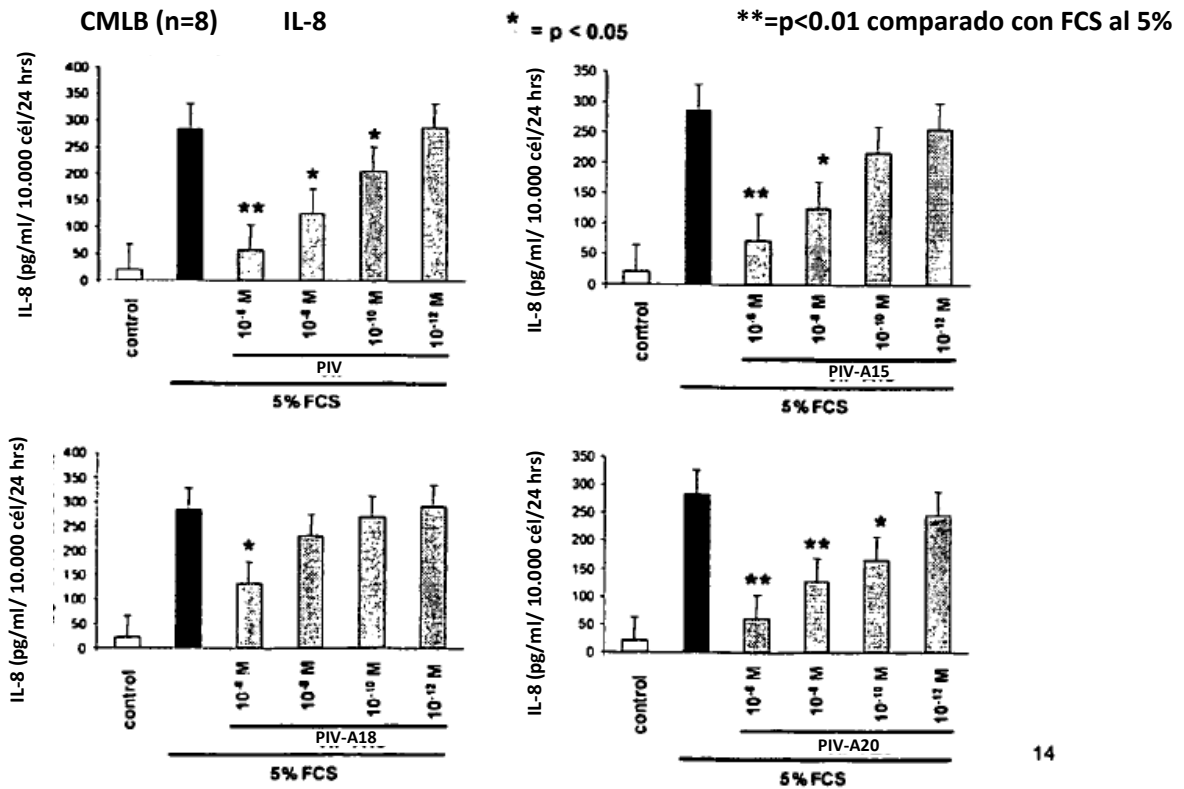


Figura 6a



13

Figura 6b



14

Figura 7

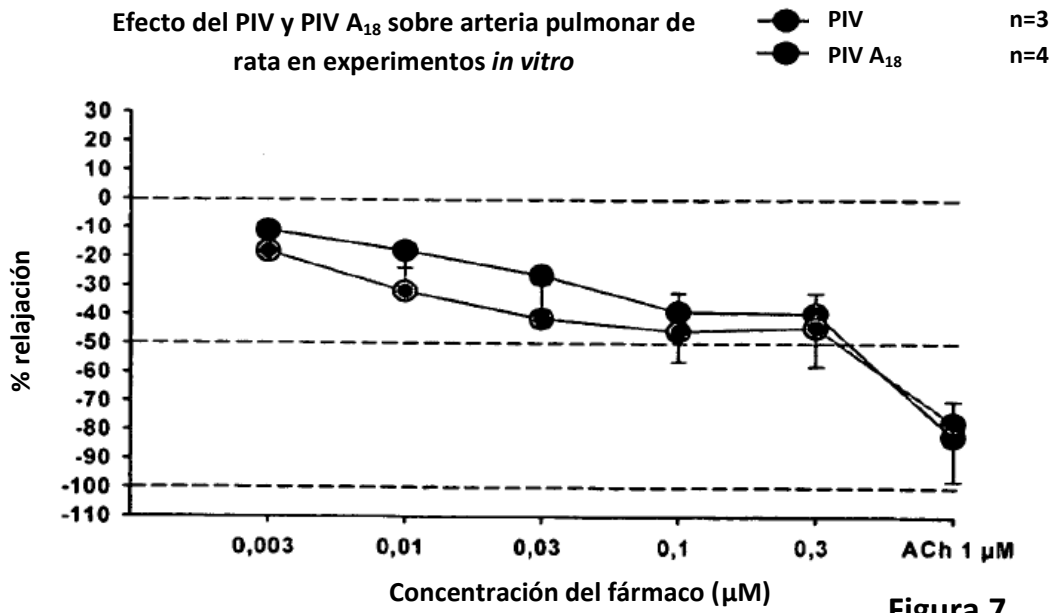


Figura 7

Figura 8

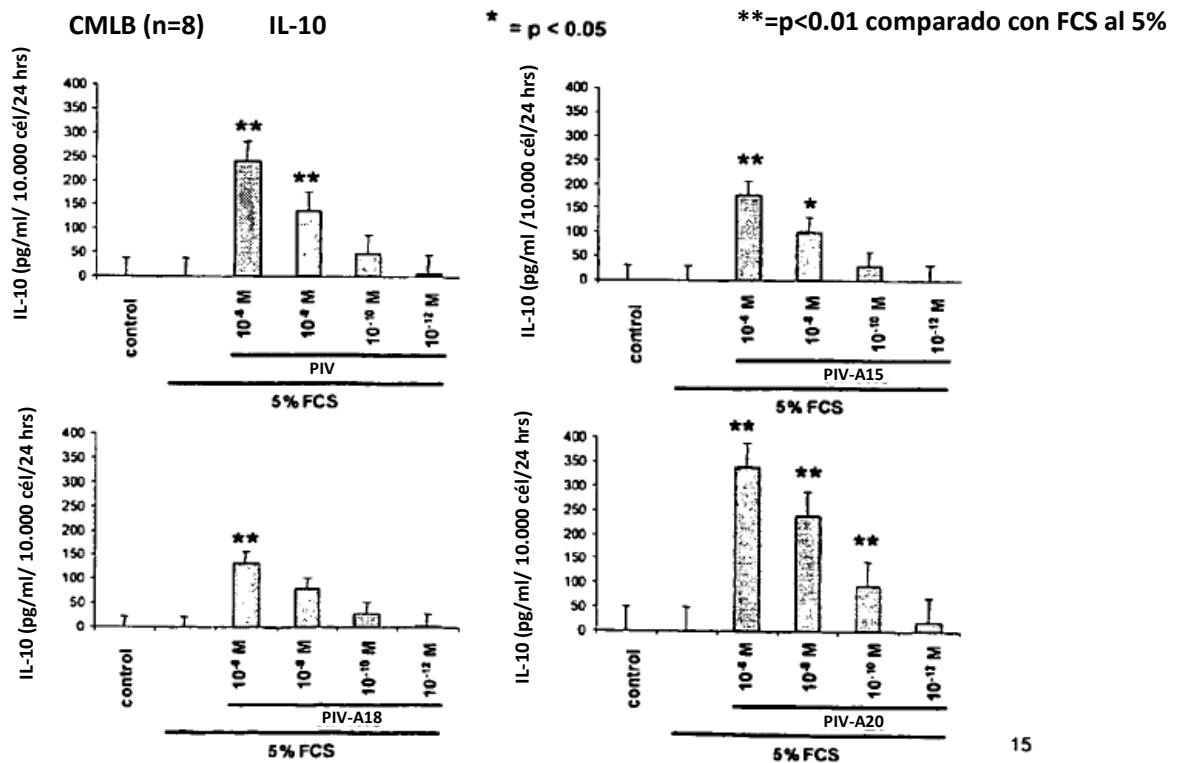


Figura 9

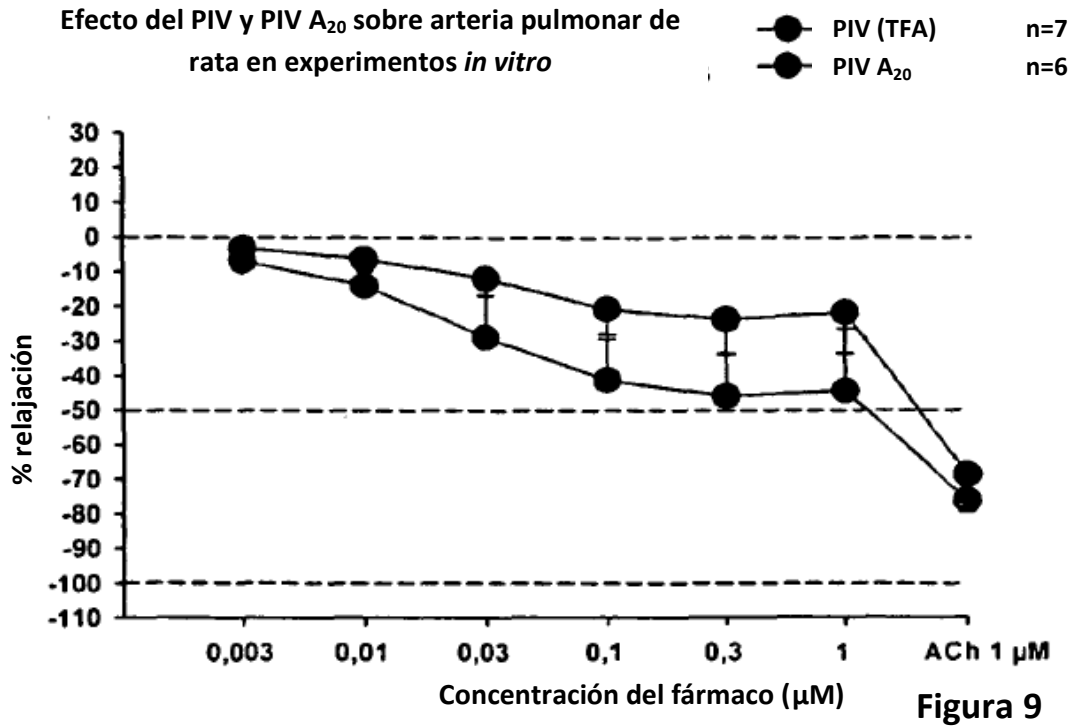


Figura 10a

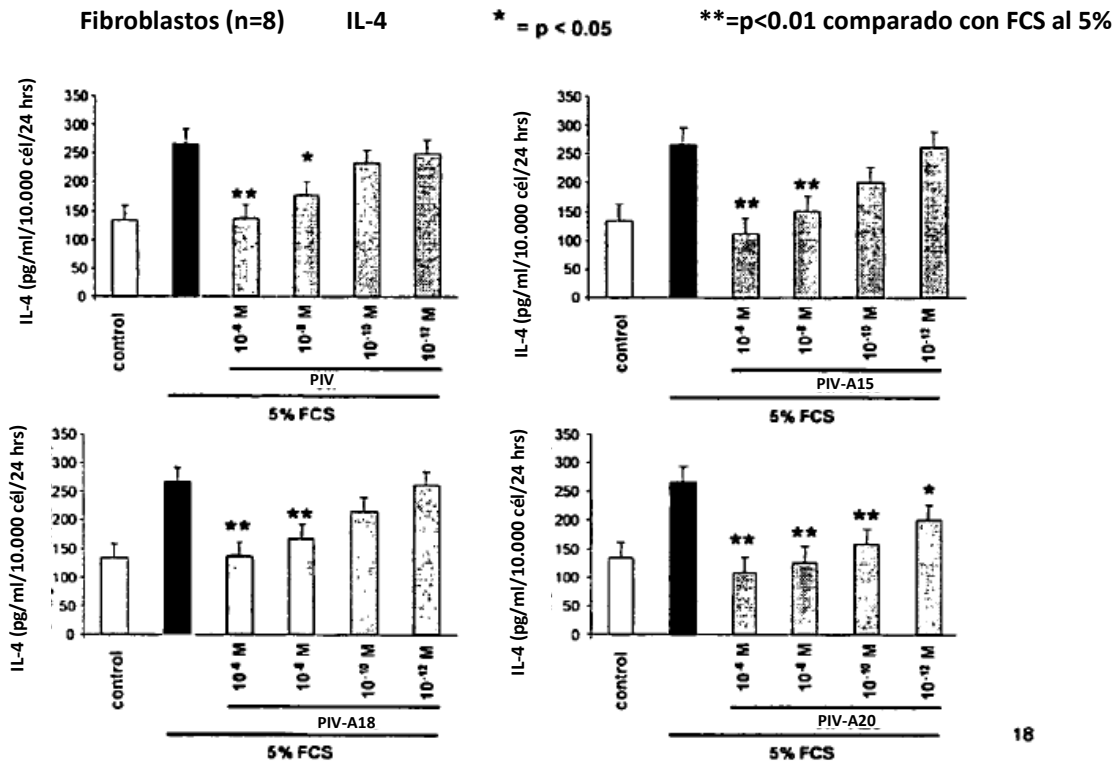


Figura 10b

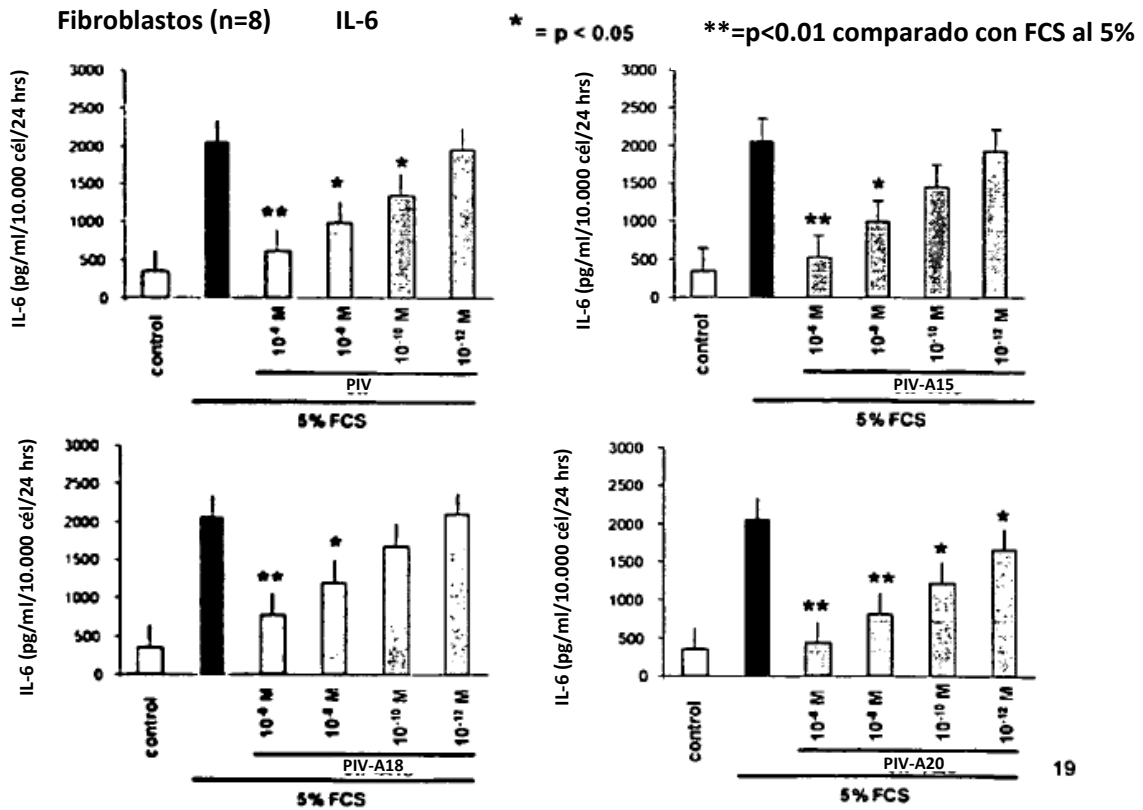
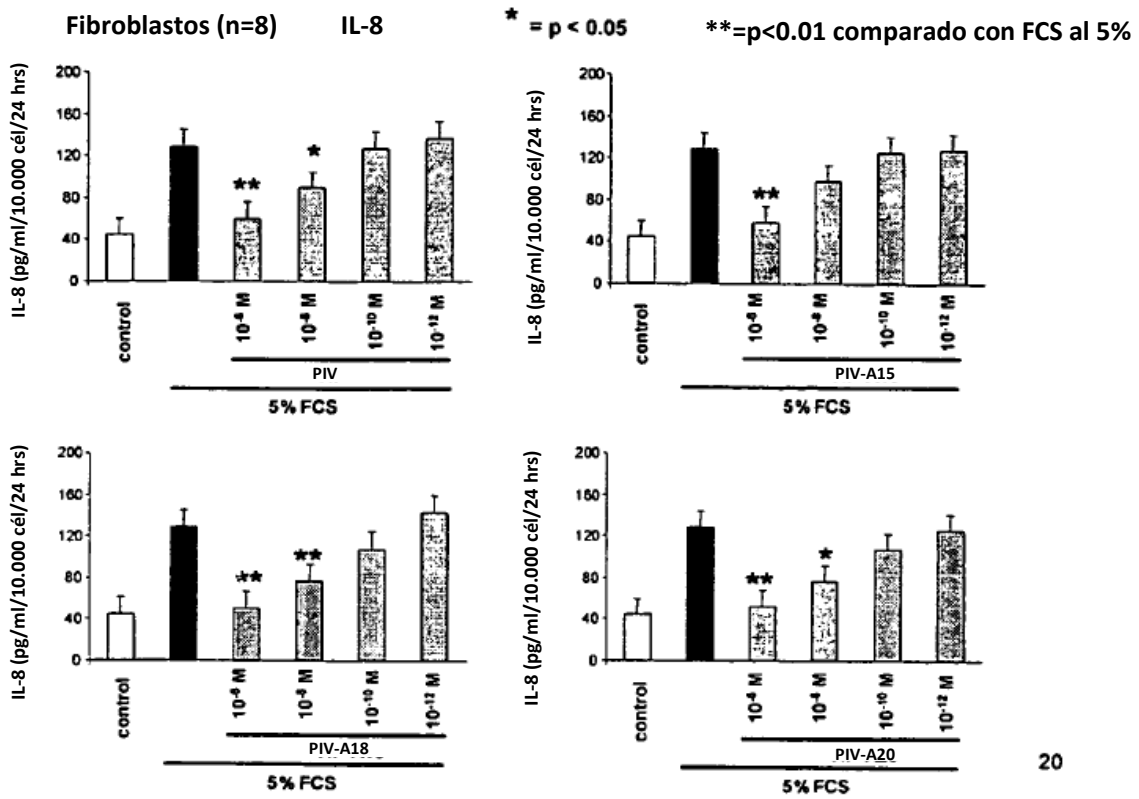
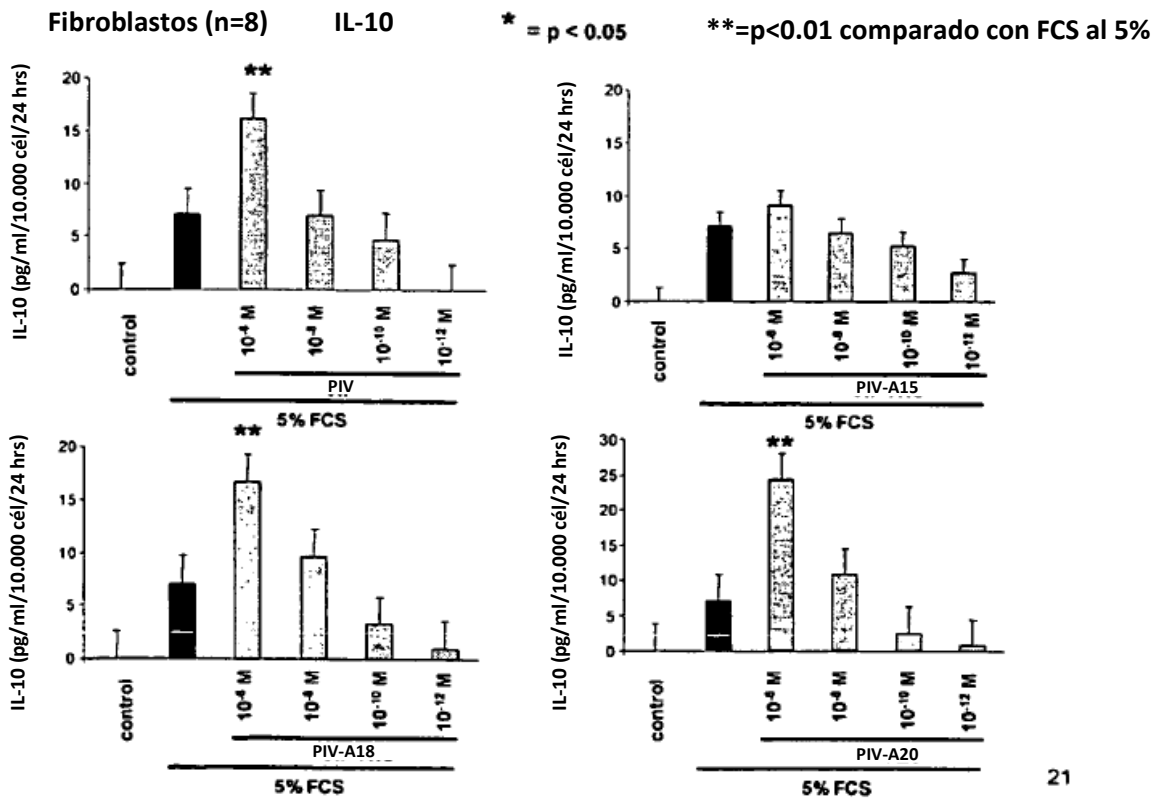


Figura 11a



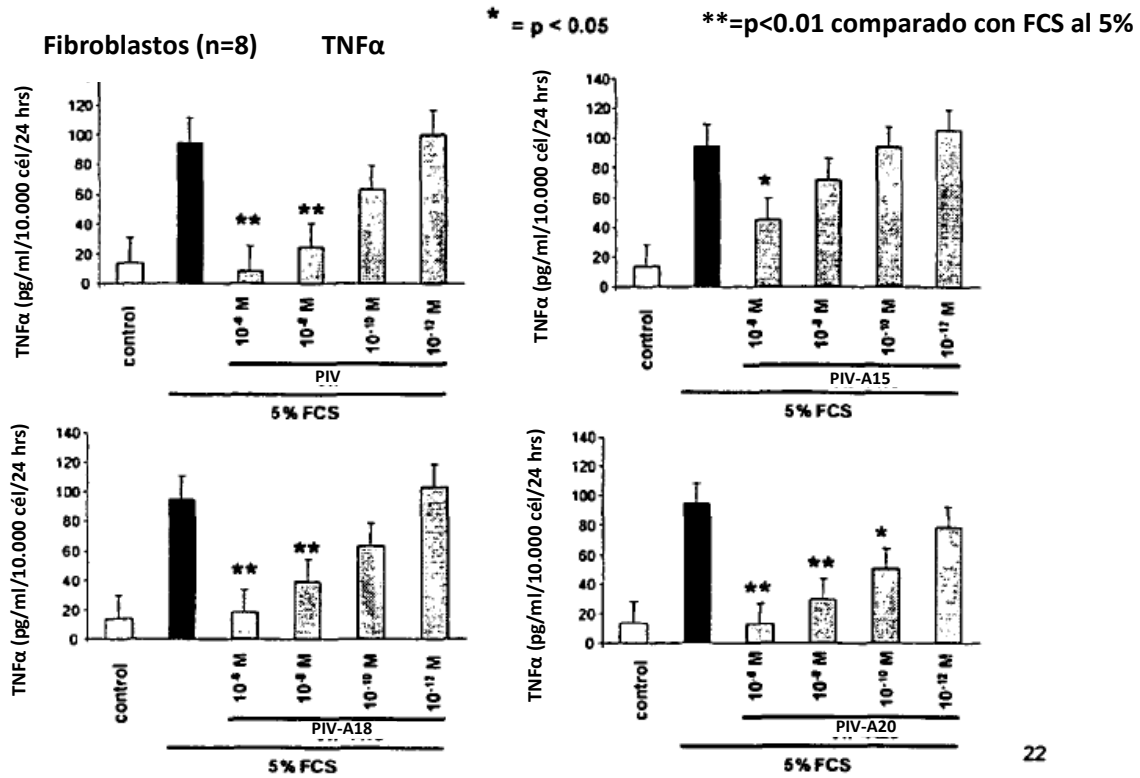
20

Figura 11b



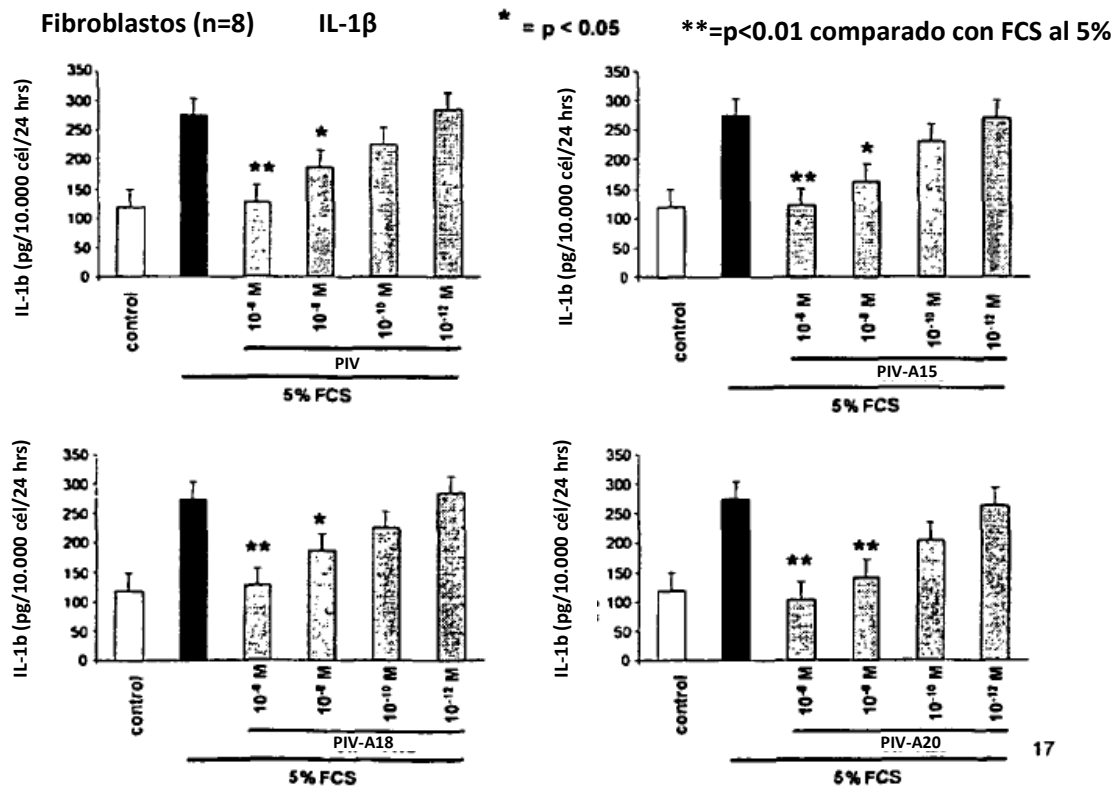
21

Figura 12a



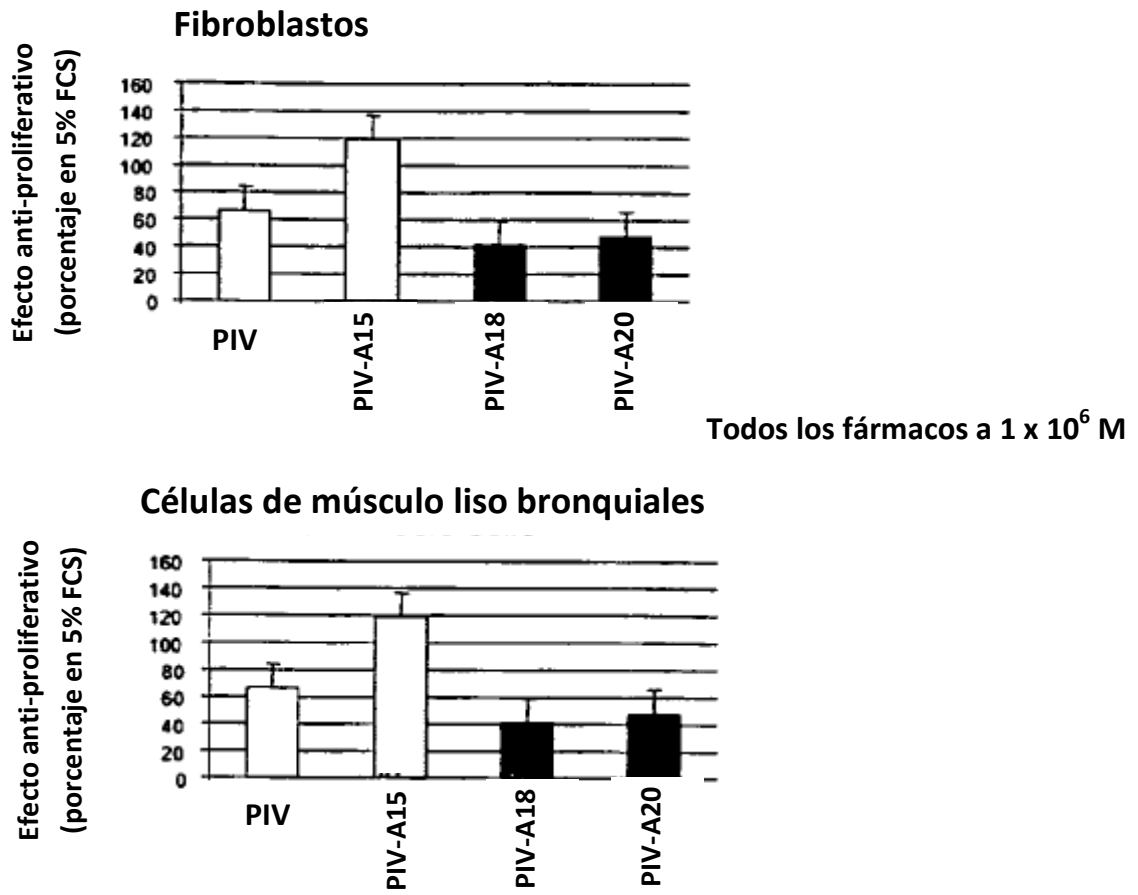
22

Figura 12b



17

Figura 13



REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es, únicamente, para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente europea. Si bien se ha tenido gran cuidado al compilar las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP declina toda responsabilidad a este respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 0361680 A [0015]
- WO 0243746 A [0020]
- WO 9106565 A [0027] [0048]
- EP 0536741 A [0027]
- US 3880826 A [0027]
- EP 0204447 A [0027]
- EP 0405242 A [0027]
- WO 9527496 A [0027] [0048]
- EP 0463450 A [0027]
- EP 0613904 A [0027]
- EP 0663406 A [0027] [0048]
- WO 9735561 A [0027] [0048]
- EP 0620008 A [0027]
- WO 8905857 A [0048]
- WO 9729126 A [0048]
- WO 200024278 A [0050]

Literatura no patente citada en la descripción

- Remington's Pharmaceutical Sciences. Mack Publishing Co, [0051]
- J Pharm Pharmaceut Sci, 2000, vol. 3 (2), 234-258 [0057]