

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 758**

51 Int. Cl.:

C07K 14/525 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008** **E 08859641 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012** **EP 2217619**

54 Título: **Proteína ciclica libre de cisteína**

30 Prioridad:

12.12.2007 AT 20142007

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.03.2013

73 Titular/es:

**APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG
GMBH (100.0%)
c/o mingo bueros Mariahilferstrasse 136,
Top 1.15
1150 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD y
LUCAS, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 398 758 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

Proteína cíclica libre de cisteína

La presente invención se refiere a una proteína cíclica libre de cisteína, que puede usarse como medicamento, por ejemplo para la activación de canales iónicos epiteliales, para la mejora de la función pulmonar, así como para el tratamiento de edemas, como los edemas pulmonares.

El transporte de líquidos a través de capas celulares y tejido se basa fundamentalmente en un gradiente osmótico a través de un transporte activo de iones vectorial, por ejemplo, transporte de sodio. Éste se efectúa principalmente a través de canales iónicos regulados estrictamente y de importancia vital, tal como por ejemplo el complejo de canal de sodio epitelial (ENaC). El agua sigue este gradiente de manera pasiva, entre otros, a través de canales de agua especiales, como el canal de agua acuaporina V. Para el tejido pulmonar se conoce que, de manera basolateral a las células que bombean, las Na⁺/K⁺ ATPasas realizan el transporte vectorial de sodio al intersticio y finalmente los iones a los vasos linfáticos y sanguíneos. Este transporte es, por tanto, activo y tiene lugar independientemente de la presión transpulmonar y la concentración alveolar de proteína.

Un edema es una acumulación patológica de líquido en un órgano, como por ejemplo el pulmón, pero también en el cerebro o en la piel. En caso de un edema en el pulmón se habla de un edema pulmonar. El edema pulmonar se base generalmente en el desequilibrio entre la extravasación de líquido y la resorción de líquido. Muy a menudo está también dañada la permeabilidad del tejido pulmonar, de modo que tiene lugar un mayor aporte de líquido y el líquido se acumula en las cavidades pulmonares (alvéolos).

Un trastorno de la permeabilidad de este tipo, como consecuencia de la ausencia de un transporte de retorno de líquido desde los alvéolos al intersticio, es especialmente significativo en la lesión aguda del pulmón (en inglés *Acute Lung Injury*, ALI) o en el síndrome de dificultad respiratoria aguda (en inglés *Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) o en el síndrome respiratorio agudo grave (SARS), en la neumonía o en el fallo multiorgánico. El trastorno de la permeabilidad desempeña también un papel en otras enfermedades pulmonares, tal como en daños pulmonares inducidos por ventilación asistida, trasplantes de pulmón, daños pulmonares asociados con transfusión, administración terapéutica de IL-2 o asma.

Como resultado de una acumulación de líquido aumentada en el tejido u órgano, por ejemplo, en el pulmón, se dificulta o se restringe completamente el necesario intercambio de gases. No pasa nada de oxígeno desde el aire de respiración a la sangre, de modo que producirse daños orgánicos letales por falta de oxígeno.

No hay ninguna terapia convencional general para el tratamiento del edema de permeabilidad. En general los esfuerzos van dirigidos a proporcionar ventilación artificial a los pacientes con edema pulmonar, para garantizar el aporte de oxígeno a la sangre y, de ese modo, a los órganos.

Por el documento DE 38 41 759 se conocen distintos péptidos derivados del factor de necrosis tumoral (TNF).

El documento EP 1 452 868 se refiere un procedimiento para la selección, a partir de una biblioteca de compuestos, de un compuesto que es eficaz como medicamento, describiéndose diferentes péptidos.

En el documento WO 90/06945 se describen, entre otros, péptidos que serían adecuados para la lucha contra enfermedades.

En von Carswell *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975 se notificó que el suero de animales tratados con endotoxina, que antes se habían infectado con la cepa de *Mycobacterium Calmette-Guerin* (BCG), provocaba una necrosis hemorrágica en diferentes tumores en el ratón. Esta actividad se atribuyó al factor de necrosis tumoral. El TNF muestra también *in vitro* un efecto citostático y citotóxico frente a una pluralidad de líneas celulares transformadas, mientras que las líneas celulares normales humanas y animales no se ven afectadas por ello (M. R. Ruff *et al.*, Lymphokines, Vol. II, Academic Press Inc., Nueva York, 1981, págs. 235-275). Se han descrito ya la caracterización bioquímica y el gen para el TNF humano (D Pennica *et al.*, Nature 312, 724, 1984; Aggarwal, B. B. *et al.*, J. Biol. Chem. 260, 2334-2345, 1985; Nedwin, G.E. *et al.*, Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985).

A partir de estos datos pudo derivarse la siguiente estructura proteica para el factor de necrosis tumoral (TNF) maduro humano:

(NH₂)Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu(COOH)

Además se ha descrito el gen TNF de la vaca, el conejo y el ratón (Goeddel D. V. *et al.*, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 597, 1986).

Además de sus propiedades citotóxicas, el TNF está implicado conjuntamente de manera principal en reacciones inflamatorias (J.W. Larrick *et al*, Pharmac. Res. Vol. 5, n.º 3, 129-139, 1988). En el modelo animal pudo mostrarse la participación del TNF en el choque septicémico (Torti F. M. *et al*, Science 229, 867-869, 1985) y la enfermedad del injerto contra huésped (Piguet, P F *et al*, J. Exp. Med. 166, 1280, 1987).

En Lucas R *et al*, Science (1994) Vol. 263. n.º 5148, págs. 814 - 817 se describe un péptido, que se derivó de la región Ser(99) a Glu(116) del TNF, y que se propone para el tratamiento de edemas. Este péptido es también el objeto del documento WO 00/09149. Sin embargo, para hacer que este péptido del documento WO 00/09149 fuera útil, tuvo que sustituirse artificialmente la posición Pro(100) por el aminoácido cisteína y la posición Cys(101) por el aminoácido glicina. Como el péptido lineal Ser(99) a Glu(116) no tenía ningún efecto según la invención (Hribar M. *et al*, Eur. J. Immunol. (1999), Vol. 29, 3105-3111; Braun C., J. Immunol. (2005), 175: 3402-3408; Fukuda N. *et al*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2001) 280: L1258-L1265), tuvo que sustituirse adicionalmente la posición Glu(116) por el aminoácido cisteína.

Un péptido de este tipo, descrito en el documento WO00/09149, no es adecuado para la producción de medicamentos, ya que contiene dos cisteínas en las posiciones (100) y (116), que, como es sabido, en disolución se reducen, rompiéndose el puente disulfuro entre las cisteínas y se abre la estructura cíclica del péptido, con lo que el péptido se hace inactivo.

Se descubrió ahora sorprendentemente un péptido cíclico libre de cisteína, que se deriva del factor de necrosis tumoral (TNF) maduro y que presenta interesantes propiedades biológicas.

El factor de necrosis tumoral (TNF) maduro, tal como se usa en el presente documento, es preferiblemente el factor de necrosis tumoral maduro humano.

En un aspecto, la presente invención pone a disposición una proteína que se selecciona de la secuencia de aminoácidos de la región valina Val(91) a glicina Gly(121), o una parte de la misma, del factor de necrosis tumoral maduro humano, con la condición de que la proteína comprenda por lo menos la secuencia de aminoácidos de la región lisina Lys(98) a ácido glutámico Glu(116), sustituyéndose la cisteína Cys(101) por una glicina y estando formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(98) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(116), y presentando la estructura proteica para el factor de necrosis tumoral (TNF) maduro humano la siguiente secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3:

(NH₂)Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu(COOH).

Una proteína que se pone a disposición según la presente invención se denominará en el presente documento también "proteína según la presente invención".

Según la presente invención proteínas especialmente adecuadas con las secuencias de aminoácidos

SEQ ID:NO:1

(NH₂)Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Tyr-Leu-Gly(COOH), en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(8) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(26), y

SEQ ID:NO:2

(NH₂)Lys-Ser-Pro-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Glu(COOH), en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(1) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(19).

Puede producirse una proteína según la presente invención de manera adecuada, por ejemplo, de manera análoga a un procedimiento conocido, o tal como se describe en el presente documento, por ejemplo mediante síntesis química por medio de química de péptidos o por medio de un procedimiento microbiológico. La introducción del enlace amida entre el grupo amino libre y el grupo carboxilo libre puede tener lugar igualmente de manera adecuada, por ejemplo, de manera análoga a un procedimiento conocido, o tal como se describe en el presente documento.

Una proteína según la presente invención puede encontrarse en forma libre, o en forma de una sal, por ejemplo en forma de una sal de adición de ácido, tal como una sal de acetato o una sal de ácido trifluoroacético, y en otro aspecto adicional la presente invención pone a disposición una proteína según la presente invención en forma de una sal.

Se ha mostrado que una proteína según la presente invención muestra una actividad biológica interesante y por tanto puede usarse como medicamento.

En un aspecto adicional la presente invención pone a disposición una proteína según la presente invención para su uso como medicamento, por ejemplo, el uso de una proteína según la presente invención como medicamento.

5 Por ejemplo, exámenes biológicos en células humanas muestran que una proteína según la presente invención a diferencia del TNF humano tampoco presenta prácticamente propiedades inflamatorias o tóxicas. Para el examen, se mezclan y se incuban de la manera habitual en laboratorio células inmunitarias humanas de la sangre con proteína según la presente invención a baja concentración. A continuación se determinan mediante métodos habituales en medios de cultivo libres de células proteínas marcadoras para inflamaciones. A pesar de la adición de una proteína según la presente invención, por ejemplo una proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o
10 SEQ ID NO:2 no pueden detectarse aquellas proteínas inflamatorias, tales como por ejemplo el marcador de inflamación interleucina-6 (IL-6).

Puede usarse una proteína según la presente invención en un procedimiento para la prevención de inflamaciones, por ejemplo para la prevención de la formación de marcadores de inflamación, tal como IL-6, en la aplicación médica de proteínas que se derivan del factor de necrosis tumoral, por ejemplo, del factor de necrosis tumoral humano.
15

Es además un método habitual en el laboratorio y se describe por ejemplo en Clunes M.T. *et al*, J Physiol volumen 557, número 3, 809-819 (15 de junio de 2004), la detección de la activación de canales iónicos por medio de experimentos de registro electrofisiológico de fijación de tensión (*patch-clamp*). Para los experimentos de *patch-clamp* de canales iónicos se llena una cánula de vidrio fina con disolución tampón neutra. La cánula de vidrio (pipeta *patch-clamp*) se presiona con cuidado sobre una célula epitelial intacta. Por debajo de la pipeta se encuentra un fragmento de membrana. Entre el interior de la pipeta y la disolución externa se crea de este modo una resistencia eléctrica. En la disolución de la pipeta se sumerge un electrodo, que está conectado a un amplificador sensible.
20

Es sorprendente encontrar que una proteína según la presente invención, por ejemplo una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 que, tal como se describe en el presente documento, está ciclada a través de un enlace amida, activa los canales iónicos epiteliales, lo que puede detectarse por la variación de la amplitud de la señal eléctrica. Dado que una proteína según la presente invención no contiene cisteína o un puente disulfuro, una proteína de este tipo tampoco puede reducirse.
25

Para la simulación de un daño pulmonar agudo y para la formación de un edema pulmonar puede, de la forma habitual en el laboratorio, lavarse varias veces el pulmón de animales de experimentación, por ejemplo ratones o ratas, con solución salina acidificada (por ejemplo, según Isik F. *et al*, Eur J Cardiothorac Surg (2005); 28: 301-305). De este modo se produce una reducción de la función pulmonar. Si se inyecta ahora en el pulmón de los animales de experimentación una proteína según la presente invención, por ejemplo una proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, que está ciclada a través de un enlace amida tal como se describe en el presente documento, como nebulización o disolución acuosa, se produce entonces una clara mejora de la función pulmonar en el plazo de desde 3 hasta 5 horas, que se hace patente por el aumento en el contenido en oxígeno en la sangre arterial. De este modo puede usarse una proteína según la presente invención para el tratamiento de edemas, tales como los edemas pulmonares.
30
35

El tratamiento de enfermedades que están asociadas a la función pulmonar incluye por ejemplo la activación de canales iónicos epiteliales, la mejora de la función pulmonar y/o el tratamiento de edemas, tales como los edemas pulmonares, el tratamiento
40

- de la lesión pulmonar aguda (en inglés *Acute Lung Injury*, ALI)

- del síndrome de dificultad respiratoria aguda (en inglés *Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS)

- del síndrome respiratorio agudo grave (SARS),

- de la neumonía,

45 - en el caso de fallo multiorgánico,

- en el caso de daños pulmonares inducidos por ventilación asistida, trasplantes de pulmón, daños pulmonares asociados con transfusión, administración terapéutica de IL-2 o asma,

por ejemplo la activación de canales iónicos epiteliales, la mejora de la función pulmonar y/o el tratamiento de edemas, tales como los edemas pulmonares.

50 En otro aspecto la presente invención pone a disposición una proteína según la presente invención para su uso en el tratamiento de edemas pulmonares.

Un paciente, tal como se usa en el presente documento incluye mamíferos, por ejemplo el ser humano.

Una proteína según la presente invención puede administrarse en forma de preparación farmacéutica.

En otro aspecto la presente invención pone a disposición una preparación farmacéutica que está caracterizada porque comprende una proteína según la presente invención, por ejemplo, en combinación con al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, como un vehículo o diluyente, por ejemplo, cargas, aglutinantes, mejoradores de la fluidez, lubricantes, saborizantes, azúcares o edulcorantes, aromatizantes, conservantes, agentes con efecto estabilizante, tensioactivos, emulsionantes, solubilizantes, sales para la regulación de la presión osmótica y/o tampones (mezclas).

La cantidad adecuada de una proteína según la presente invención para el tratamiento de enfermedades dependerá naturalmente en gran medida de distintos parámetros, por ejemplo, de la naturaleza química y de la farmacocinética de la proteína usada, del paciente individual, de la enfermedad a tratar, del tipo de aplicación, pero una dosis diaria satisfactoria en mamíferos grandes incluye, por ejemplo, una cantidad de desde 0,0001 g hasta 1,5 g, por ejemplo de 0,001 mg/kg de peso corporal a 20 mg/kg de peso corporal. La aplicación puede ser pulmonar o parenteral, y es preferiblemente parenteral. Una preparación farmacéutica según la presente invención puede producirse de manera adecuada, por ejemplo, de manera análoga a un método conocido, por ejemplo mediante procedimientos de mezclado, granulación, recubrimiento, disolución, liofilización.

Descripción de los dibujos

La figura 1A muestra el cromatograma de HPLC de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1. Unidades: eje y: absorción en mAU; eje x: tiempo en minutos.

La figura 1B muestra el cromatograma de HPLC de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2. Unidades: eje y: absorción en mAU; eje x: tiempo en minutos.

La figura 2A muestra la activación de canales iónicos de sodio por una proteína de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1. Unidades: eje y: cantidad; eje x: amplitud en pA.

La figura 2B muestra la activación de canales iónicos de sodio por una proteína de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2. Unidades: eje y: cantidad; eje x: amplitud en pA.

La figura 3A muestra el aumento del contenido en oxígeno en sangre arterial tras la administración de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1. Unidades: eje y: contenido en oxígeno en %; eje x: momento de medición en minutos.

La figura 3B muestra el aumento del contenido en oxígeno en sangre arterial tras la administración de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2. Contenido en oxígeno en %; eje x: momento de medición en minutos.

Ejemplo 1: Síntesis de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(8) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(26)

Se sintetizó una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 por medio de síntesis en fase sólida de Fmoc de manera totalmente automática en las siguientes etapas:

Etapas	Proceso	Producto
1	Acoplamiento de los aminoácidos	Péptido (proteína) unido a la fase sólida
2	Separación de la fase sólida	Péptido (proteína) en disolución
3	Purificación	Péptido (proteína) purificado como sal de TFA
4	Purificación / intercambio de sales	Péptido (proteína) purificado como sal de acetato
5	Examen analítico	Péptido (proteína) purificado

La ciclación tuvo lugar mediante la unión del grupo amino épsilon de la lisina (posición 8) con el grupo carboxilo gamma del ácido glutámico (posición 26) con formación de un enlace amida. Esto tiene lugar, por ejemplo, porque el grupo carboxilo gamma del grupo glutamina pasa a ser, por medio de dicitclohexilcarbodiimida (DCC), un éster activo, que a continuación reacciona espontáneamente con el grupo amino épsilon de la lisina formándose un cierre de anillo en la proteína. A continuación se examinó la proteína por medio de HPLC inversa, obteniéndose el resultado tal como se muestra en la figura 1A.

Ejemplo 2: Síntesis de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(1) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(19)

Se sintetizó una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 por medio de síntesis en fase sólida de Fmoc de manera totalmente automática en las siguientes etapas:

Etapa	Proceso	Producto
1	Acoplamiento de los aminoácidos	Péptido (proteína) unido a la fase sólida
2	Separación de la fase sólida	Péptido (proteína) en disolución
3	Purificación	Péptido (proteína) purificado como sal de TFA
4	Purificación / intercambio de sales / ciclación oxidativa	Péptido (proteína) purificado como sal de acetato
5	Examen analítico	Péptido (proteína) purificado

La ciclación tuvo lugar mediante la unión del grupo amino épsilon de la lisina (posición 1) con el grupo carboxilo gamma del ácido glutámico (posición 19) con formación de un enlace amida. Esto tiene lugar, por ejemplo porque el grupo carboxilo gamma del grupo glutamina pasa a ser, por medio de dicitohexilcarbodiimida (DCC), un éster activo que a continuación reacciona espontáneamente con el grupo amino épsilon de la lisina formándose un cierre de anillo en la proteína. A continuación se examinó la proteína por medio de HPLC inversa, obteniéndose el resultado tal como se muestra en la figura 1B.

Ejemplo 3: Cultivo celular

Se realizaron los experimentos electrofisiológicos en células H441 humanas. Las células H441 son células epiteliales de pulmón humanas que intervienen en la difusión de agua y electrolitos en el pulmón. Se tomaron las células H441 de la American Tissue Culture Collection (Colección Americana de Cultivos Tisulares) y se cultivaron en frascos de cultivo celular convencionales en medio RPMI 1640 (Invitrogen). El medio de cultivo celular contenía adicionalmente 4,5 g/litro de glucosa, penicilina/estreptomicina al 1% y suero bovino fetal al 5%. Para los experimentos de *patch clamp* se llevaron las células a portaobjetos de vidrio.

Ejemplo 4: Activación de canales iónicos de células epiteliales humanas por proteínas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2

Se derivaron corrientes macroscópicas y corrientes de canales individuales de las células H441 en la configuración "whole cell" ("de células completas") y "cell-attached" ("unida a células") de la técnica "patch-clamp" (Hamill *et al*, Pflugers Arch. 1981, 391(2):85-100, (1981).

Para la medición de canales iónicos individuales se disolvieron las proteínas en una disolución de gluconato de sodio 135 mM, NaCl 15 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 2 mM, glucosa 5 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 y se llenó la pipeta de tipo patch. Si despolarizó el potencial de membrana celular a 0 mV por medio de la disolución despolarizante de KCl 140 mM, NaCl 15 mM, MgCl₂ 5 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4. Durante las mediciones se ajustó una tensión (*patch*) de -100 V.

Se realizó este protocolo con la adición de proteínas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2, así como el inhibidor del canal de sodio amilorida. Se almacenaron las derivaciones de corriente así obtenidas y se analizaron con la ayuda del programa PCLAMP 6.0.

Los resultados, en los que se muestra la activación de los canales iónicos de sodio mediante las proteínas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO:1 y SEQ ID NO:2, pueden verse en la figura 2A y la figura 2B.

Ejemplo 5: Estudio experimental en animales del edema pulmonar.

Se anestesian ratas Wistar macho (peso de 250 g a 350 g) con Rompun® (0,02 ml/100 g) y Ketavet® (0,1 ml/100 g). La ventilación artificial tiene lugar con un ciclo de 72 pulsos/minuto, con un tiempo de inspiración de 0,2 segundos y un tiempo de expiración de 0,5 segundos. La temperatura corporal asciende a un promedio de 37°C a 39°C. En el estado normal la PaO₂ (presión parcial de oxígeno arterial) asciende a de 500 a 550 mm Hg. Para la simulación de un daño pulmonar agudo y para la formación de un edema pulmonar se lava el pulmón de 7 a 9 veces con solución salina acidificada (pH 5).

Tras una hora se disuelven las proteínas con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 en solución salina estéril, se administran por vía intratraqueal como nebulización (volumen máximo administrado de 0,5 ml).

Con una separación de en cada caso 60 minutos se les extrae a los animales sangre arterial (0,1 ml) y se determina el contenido en oxígeno en % con respecto al valor normal.

Tras la administración de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o SEQ ID NO:2 el contenido de oxígeno en sangre está aumentado, como puede verse en la figura 3A o la figura 3B, véase también el ejemplo 6.

Ejemplo 6: Mejora de la función pulmonar mediante proteínas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID

NO:1 y SEQ ID NO:2

La detección del efecto estimulante de una proteína según la presente invención, por ejemplo de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2 o SEQ ID NO:3, sobre la función pulmonar tiene lugar por medio de estudios de experimentación animal, en los que se induce un edema pulmonar. El modo de proceder experimental se describe en el ejemplo 5.

Para la inhalación intratraqueal se disuelven en cada caso 125 µg de proteína en solución salina 150 mM a pH 7,3. Se mide el contenido en oxígeno de la sangre arterial inmediatamente antes del lavado de los pulmones, 60 minutos tras el lavado de los pulmones y 180 minutos tras el lavado de los pulmones.

Se fija el contenido en oxígeno inmediatamente antes del lavado de los pulmones como el 100%. 60 minutos tras en cada caso el último lavado de pulmón, el contenido en oxígeno en sangre asciende en promedio a sólo un 20%. En el plazo de 3 horas aumentó el contenido porcentual en oxígeno hasta valores del 62% en el caso del tratamiento con una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 o del 75% en el caso del tratamiento con una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

Sin adición de proteína no se produce ninguna mejora de la función pulmonar en el plazo de 180 minutos tras el lavado de pulmón (contenido en oxígeno del 20%).

Los resultados se representan en

- la figura 3A para una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1,

- la figura 3B para una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2.

Ejemplo 7: Determinación de parámetros de inflamación

La sangre fresca humana reacciona muy sensiblemente a moléculas proinflamatorias, entre otros con la liberación del marcador de inflamación interleucina-6 (IL-6). Para la determinación de la reacción proinflamatoria se incubaron muestras de sangre fresca humana con concentraciones de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 en concentraciones sucesivas de desde 1 ng/ml hasta 10 µg/ml. Tras una incubación de 24 horas a 37°C se determinó cuantitativamente el marcador de inflamación interleucina-6 en la disolución por medio de ELISA. Como control positivo sirvió LPS (concentraciones de 3 ng/ml y 100 ng/ml).

A este respecto se obtuvieron los datos de medición que se indican en la tabla 1 e indican la influencia del péptido, la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 en comparación con LPS sobre la liberación del marcador de inflamación interleucina-6 a partir de células sanguíneas:

Tabla 1

Concentración de la proteína o LPS.	Proteína SEQ ID NO:2	Control positivo "LPS"
	Concentración de interleucina-6 (pg/ml) (promedio de cinco mediciones)	
sin adición de proteína (valor normal en sangre)	menos de 0,5	menos de 0,5
10 µg/ml	menos de 0,5	195,640
1 µg/ml	menos de 0,5	108,370
3 ng/ml	menos de 0,5	34,867
1 ng/ml	menos de 0,5	no determinado

Los datos de medición en la tabla 1 muestran que mediante una incubación de células inmunitarias humanas en sangre fresca con una proteína de secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 prácticamente no se libera nada de marcador de inflamación IL-6 y con ello no se desencadena ninguna reacción inflamatoria. Por el contrario, la incubación con LPS como control positivo provoca una fuerte liberación del marcador de inflamación interleucina-6.

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Fischer, Bernhard
- <120> Péptido cíclico y libre de cisteína
- <130> B 12159
- 5 <140>
- <141> 12/12/2007
- <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.3
- <210> 1
- 10 <211> 31
- <212> PRT
- <213> artificial
- <220>
- <223> péptido modificado derivado del factor de necrosis tumoral (TNF)
- 15 <400>1
- Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Gly Gln Arg Glu Thr Pro**
1 5 10 15
- Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly**
20 25 30
- <210> 2
- <211> 19
- <212> PRT
- 20 <213> artificial
- <220>
- <223> péptido modificado derivado del factor de necrosis tumoral (TNF)
- <400>2
- Lys Ser Pro Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro**
1 5 10 15
- Trp Tyr Glu**
- 25 <210> 3
- <211> 157
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 3

ES 2 398 758 T3

Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg
 20 25 30
 Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu
 35 40 45
 Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala
 85 90 95
 Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 100 105 110
 Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys
 115 120 125
 Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe
 130 135 140
 Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 145 150 155

REIVINDICACIONES

1. Proteína, seleccionada de la secuencia de aminoácidos de la región valina Val(91) a glicina Gly(121) del factor de necrosis tumoral maduro humano, o de una parte de la misma, con la condición de que la proteína comprende al menos la secuencia de aminoácidos de la región lisina Lys(98) a ácido glutámico Glu(116), estando sustituida la cisteína Cys(101) por una glicina y estando formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(98) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(116), y presentando la estructura proteica para el factor de necrosis tumoral (TNF) maduro humano la siguiente secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:3:
 5 (NH₂)Val Arg Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu(COOH).
 10
2. Proteína según la reivindicación 1, con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1 (NH₂)Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Glu-Pro-Ile-Tyr-Leu-Gly(COOH), en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(8) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(26).
 15
3. Proteína según la reivindicación 1, la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:2 (NH₂)Lys-Ser-Pro-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Glu(COOH), en la que está formado un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys(1) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu(19).
 20
4. Proteína según una de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como medicamento.
5. Proteína según una de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de edemas pulmonares.
 25
6. Preparación farmacéutica, que comprende una proteína según una de las reivindicaciones 1 a 3.

Fig. 1A

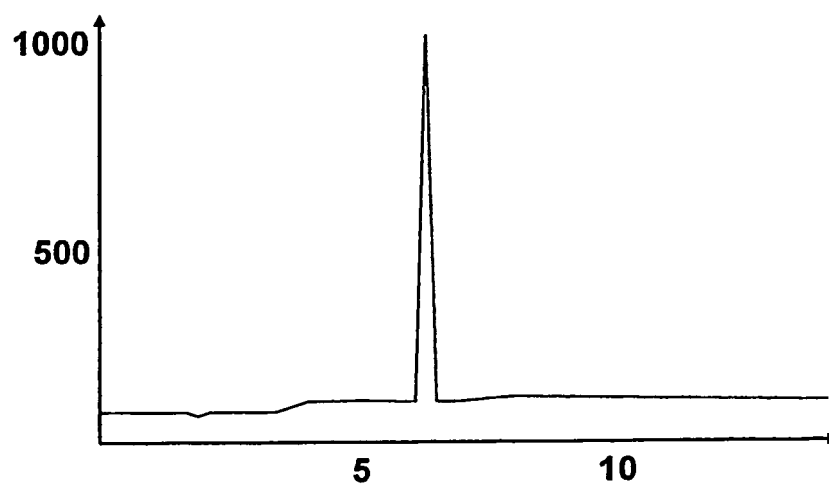


Fig. 1B

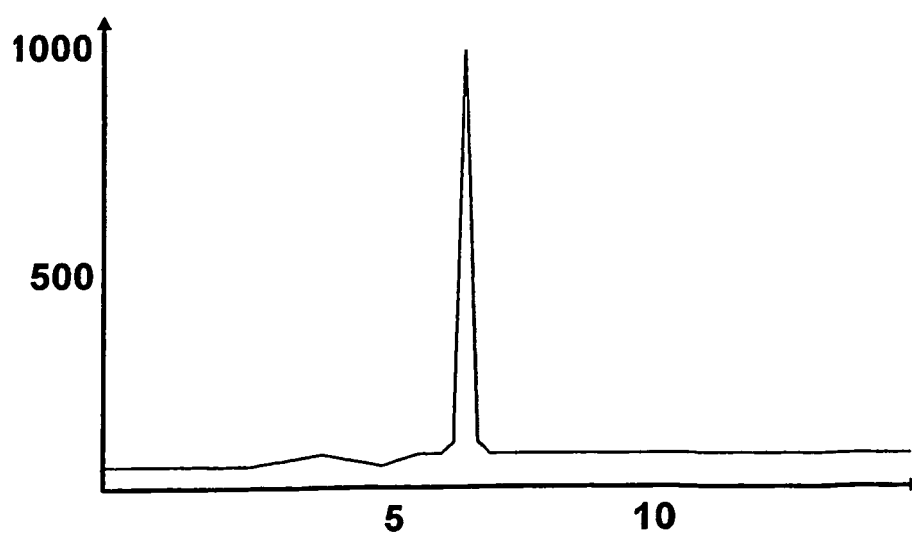


Fig. 2A

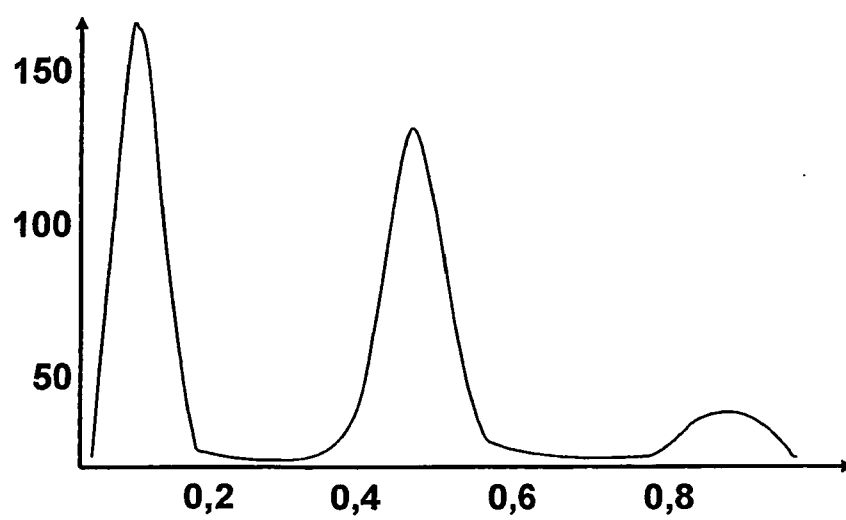


Fig. 2B

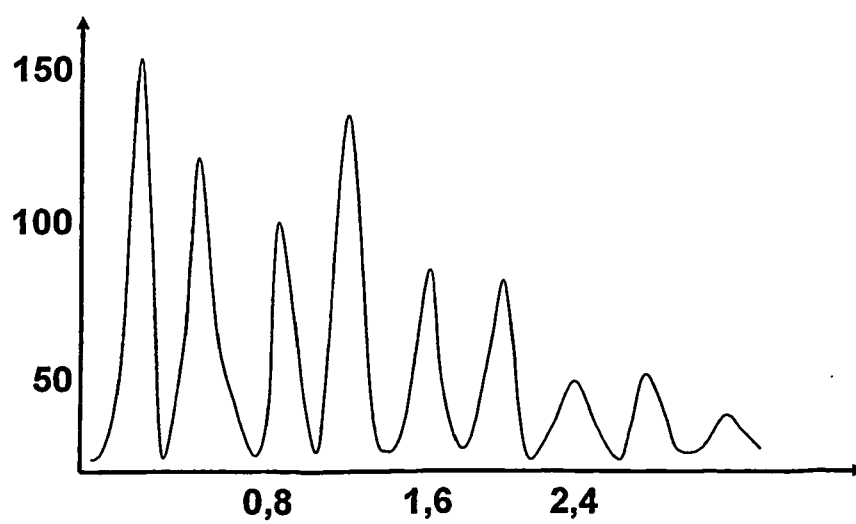


Fig. 3A

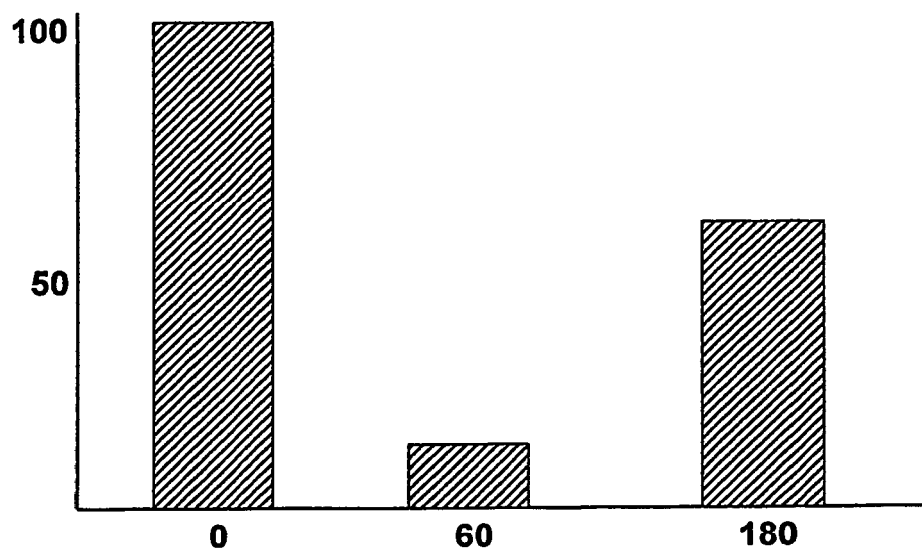


Fig. 3B

