(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 400 316**

(51) Int. CI.:

A61K 38/19 (2006.01)
C07K 14/525 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2008 E 08858971 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 2219663**

(54) Título: **Proteína inversa**

(30) Prioridad:

12.12.2007 AT 20152007

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
09.04.2013

(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

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 inversa

La presente invención se refiere a una proteína inversa, esto es, una proteína (polipéptido) de factor de necrosis tumoral, que está compuesto N-terminalmente de una o más partes C-terminales de la secuencia de aminoácidos del factor de necrosis tumoral (TNF) maduro, y C-terminalmente de una o más partes N-terminales de la secuencia de aminoácidos del TNF, en donde la proteína se puede usar como un medicamento, por ejemplo, para el tratamiento de edemas pulmonares.

El transporte de líquidos a través de capas de células y tejidos se basa principalmente en un gradiente osmótico mediante un transporte de iones vectorial activo, por ejemplo, transporte de sodio. Este se lleva a cabo principalmente a través de canales iónicos estrictamente regulados y vitalmente importantes, como por ejemplo, el complejo del canal de sodio epitelial (ENaC). El agua sigue a este gradiente de forma pasiva, entre otros, a través de canales de agua especiales, tal como el canal de agua acuaporina V. Para el tejido pulmonar se sabe que, basolateralmente en las células que bombean, las Na+/K+ ATPasas dirigen el transporte vectorial de sodio en los intersticios y finalmente de los iones en los vasos linfáticos y sanguíneos. Este transporte también es activo y se realiza independientemente de la presión transpulmonar y la concentración de proteína alveolar.

Un edema es una acumulación patológica de líquido en un órgano, como por ejemplo, en los pulmones, pero también en el cerebro o en la piel. Un edema en los pulmones se denomina edema pulmonar. El edema pulmonar se basa principalmente en el desequilibrio entre extravasación de líquido y resorción de líquido. Con mucha frecuencia también está dañada la permeabilidad del tejido pulmonar, de modo que tiene lugar un suministro aumentado de líquido, y el líquido se acumula en los alveolos pulmonares.

Tal trastorno de la permeabilidad como consecuencia de una falta de transporte de vuelta de líquido de los alveolos pulmonares al intersticio es especialmente significativo para la lesión pulmonar aguda (ALI, por sus siglas en ingles) o para el síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en ingles) o para el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG) o para la neumonía y para la insuficiencia multiorgánica. Sin embargo, la deficiencia en permeabilidad también desempeña un papel en otras enfermedades pulmonares, tales como lesiones pulmonares inducidas por la respiración, trasplantes de pulmón, lesiones pulmonares asociadas a transfusiones, administración terapéutica de IL-2 o asma.

Como resultado de una acumulación elevada de líquido en tejidos u órganos, por ejemplo, en los pulmones, el necesario intercambio de gases se dificulta o se restringe por completo. No llega oxígeno del aire respirado a la sangre, de modo que se pueden presentar lesiones orgánicas que ponen en peligro la vida debido a la falta de oxígeno.

No existe ninguna terapia estándar general para el tratamiento del edema de permeabilidad. En general, se intenta dar respiración artificial a los pacientes con un edema pulmonar, para garantizar el suministro de oxígeno a la sangre y por consiguiente a los órganos.

A partir del documento DE 38 41 759 se conocen péptidos individuales derivados de TNF.

Carswell et al., en Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975 describieron que el suero de animales tratados con endotoxina, que anteriormente se habían infectado con la cepa micobacteriana de Calmette-Guerin (BCG), produjo una necrosis hemorrágica en diferentes tumores en ratones. Esta actividad se atribuyó al factor de necrosis tumoral (TNF). El TNF también muestra un efecto citostático o citotóxico in vitro frente a un gran número de líneas celulares transformadas, mientras que el mismo no afectaba a las líneas celulares humanas y animales normales (M. R. Ruff et al, Lymphokines, Vol. II, Academic Press Inc., Nueva York, 1981, pp. 235-275). La caracterización bioquímica y el gen para el TNF humano ya se han descrito (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 se pudo deducir la siguiente estructura proteica para el factor de necrosis tumoral (TNF) maduro humano:

(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)

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

Además de sus propiedades citotóxicas, el TNF desempeña un papel fundamental en las reacciones inflamatorias (J.W. Larrick et al, Pharmac. Res. Vol. 5, No. 3, 129-139, 1988). En modelos animales se pudo mostrar la participación del TNF en el choque séptico (Torti F. M. et al, Science 229, 867-869, 1985) y la enfermedad del injerto contra el huésped (Piquet, P F et al, J. Exp. Med. 166, 1280, 1987).

Se sabe a partir de análisis bioquímicos que el TNF humano consta de diferentes elementos estructurales, como se enumeran en la tabla 1:

TABLA 1

Elemento estructural	**Posición de los aminoácidos**
CADENA β 1	30-32
CADENA β 2	45-49
CADENA β 3	54-71
CADENA β 4	76-83
CADENA β 5	85-87
CADENA β 6	91-98
CADENA β 7	101-103
Giro en U 8	104-106
CADENA β 9	107-109
CADENA β 10	113-126
CADENA β 11	131-137
HÉLICE α 12	139-141
CADENA β 13	147-153

En Lucas R et al, Science (1994) Vol. 263. no. 5148, pp. 814-817 se describe un péptido que deriva de la región Ser(99) a Glu(116) de TNF, y el cual se propone para el tratamiento de edemas. Este péptido también es el objeto del documento WO 00/09149. Sin embargo, para hacer útil este péptido del documento WO 00/09149, se debió sustituir de forma artificial la posición Pro(100) por el aminoácido cisteína y la posición Cys(101) por el aminoácido glicina. Puesto que 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), se tuvo que sustituir además la posición Glu(116) por el aminoácido cisteína, para mantener la estructura y para permitir un cierre en anillo entre ambos aminoácidos cisteína.

Una desventaja del péptido descrito en el documento WO00/09149 consiste en que dicho péptido contiene secuencias de aminoácidos artificiales, es decir que no están contenidas en el TNF en esta forma. Tal péptido provisto de estructuras artificiales será reconocido por el sistema inmune humano como exógeno. Una administración repetida o permanente de tal péptido en forma de medicamento puede provocar reacciones inmunes potencialmente mortales.

Se ha encontrado ahora, sorprendentemente, que una proteína, que está compuesta de partes de la secuencia de aminoácidos del factor de necrosis tumoral (TNF) maduro muestra propiedades biológicas interesantes, en donde tal proteína no contiene ninguna secuencia de aminoácidos artificial.

En un aspecto, la presente invención proporciona una proteína, seleccionada de las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1, (NH2)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-al(COOH); y SEQ ID:NO:2 (NH2)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-

Cys-ProSer(COOH), en donde, en cada caso, existe un cierre en anillo a través de la unión entre dos residuos de cisteína.

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

Una proteína que se proporciona según la invención, también se denomina en el presente documento como “proteína según (de) la presente invención”.

Las partes de la secuencia de aminoácidos del factor de necrosis tumoral (TNF) maduro también se denominan en el presente documento como “elementos estructurales del factor de necrosis tumoral (TNF)”.

Una proteína según la presente invención está compuesta N-terminalmente de uno o más elementos estructurales C-terminales del factor de necrosis tumoral maduro y C-terminalmente de uno o más elementos estructurales N-terminales del factor de necrosis tumoral maduro, por ejemplo, en forma de una proteína de fusión.

Los elementos estructurales del factor de necrosis tumoral maduro se definen en la tabla 1.

Una proteína según la presente invención incluye una proteína de fusión compuesta de partes de la secuencia de aminoácidos del TNF humano como se ha definido anteriormente, por ejemplo, de elementos estructurales del TNF.

Además, se ha encontrado que es particularmente ventajoso, cuando una proteína según la invención deriva N-terminalmente de los elementos estructurales C-terminales cadena β 6 hasta cadena β 10, o de la cadena β 8 hasta la cadena β 9 del TNF, y C-terminalmente de los elementos estructurales N-terminales cadena β 2 hasta cadena β 3 o cadena β 3 del TNF, siempre que al menos comprenda dos residuos de cisteína.

Según la presente invención se encontraron proteínas particularmente adecuadas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, en donde, en cada caso, existe un cierre en anillo mediante la unión entre dos residuos de cisteína.

En una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 la parte N-terminal de la proteína deriva de Ala(96) hasta Lys(112) de los elementos estructurales C-terminales cadena β 6 hasta cadena β 9 del TNF humano, y la parte C-terminal de Gly(68) hasta Val(74) de los elementos estructurales N-terminales cadena β 2 y cadena β 3 del TNF humano. Las cifras (96), (112), (68) y (74) indican las posiciones de los aminoácidos en el TNF humano.

En una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 la parte N-terminal de la proteína deriva de Lys(98) hasta Lys(112) de los elementos estructurales C-terminales cadena β 7 hasta cadena β 9 del TNF humano, y la parte C-terminal de la proteína de fusión inversa de Gly(68) hasta Ser(71) del elemento estructural N-terminal cadena β 3 del TNF humano. Las cifras (98), (112), (68) y (71) indican las posiciones de los aminoácidos en el TNF humano.

Además, se ha encontrado, sorprendentemente, que en una proteína según la presente invención está presente un cierre en anillo mediante la unión entre dos residuos de cisteína, por ejemplo, un cierre en anillo mediante la unión entre un residuo de cisteína, que procede de la secuencia de aminoácidos N-terminal del TNF, con un residuo de cisteína, que procede de la secuencia de aminoácidos C-terminal del TNF; por ejemplo, un cierre en anillo mediante un puente disulfuro entre las respectivas moléculas de azufre de ambos residuos de cisteína.

En las proteínas de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, se produce un cierre en anillo entre los dos residuos de cisteína, que corresponden a las cisteínas Cys(101) y Cys(69) en el TNF humano.

Un puente disulfuro se puede cortar, por ejemplo, de forma hidrolítica o enzimática, y si una proteína según la presente invención se encuentra en forma cíclica o no cíclica depende de las condiciones ambientales.

Una proteína según la presente invención en una forma aislada pura se encuentra en una forma cíclica.

En la estructura del TNF humano no se forma ningún cierre en anillo mediante puentes disulfuro entre las respectivas moléculas de azufre de dos residuos de cisteína.

Una proteína según la presente puede existir en forma libre, o en forma de una sal, por ejemplo, en forma de una sal de adicción ácida, tal como una sal de acetato, o una sal de ácido trifluoroacético, y en un aspecto adicional la presente invención proporciona una proteína según la presente invención en forma de sal.

Una proteína según la presente invención se puede producir de una manera adecuada, por ejemplo, de forma análoga a un proceso conocido, tal como mediante síntesis química por medio de química de péptidos o por medio de un proceso microbiológico, como por ejemplo, se describe en el presente documento.

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

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

Por ejemplo, los análisis biológicos en células humanas muestran que una proteína según la presente invención, también a diferencia del TNF (humano), no muestra prácticamente ninguna propiedad inflamatoria o tóxica. Para el análisis se mezclan células inmunes humanas de la sangre con la proteína según la presente invención a baja concentración y se incuban de la forma habitual de laboratorio. Seguidamente se determinan proteínas marcadoras para inflamaciones por métodos habituales. A pesar de la adición de una proteína de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en donde, en cada caso, se produce un cierre en anillo mediante la unión entre dos residuos de cisteína, según la presente invención, no se pueden detectar tales proteínas de inflamación, como por ejemplo, el marcador de inflamación interleuquina-6 (IL-6).

Se espera que se pueda usar una proteína según la presente invención en un proceso para prevenir las inflamaciones, por ejemplo, para prevenir la formación de marcadores de inflamación, tal como IL-6, mediante el uso médico de proteínas que derivan del factor de necrosis tumoral, por ejemplo, del factor de necrosis tumoral humano.

Además, es un método habitual de laboratorio y por ejemplo se describe en Clunes M.T. et al, J Physiol Volumen 557, Número 3, 809-819 (15 de junio, 2004), detectar la activación de canales de iones por medio de experimentos de pinzamiento zonal de membrana (patch-clamp). Para los experimentos de patch-clamp de canales iónicos se estira una cánula de vidrio fina y se llena con una solución tampón neutra. La cánula de vidrio (pipeta de patch-clamp) se presiona cuidadosamente sobre una célula epitelial intacta. Por debajo de la pipeta se encuentra un trozo de membrana. Entre el interior de la pipeta y la solución externa se produce de esta manera una resistencia eléctrica. En la solución de la pipeta se sumerge un electrodo que está conectado a un amplificador sensible.

Es sorprendente encontrar ahora que una proteína con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en donde, en cada caso, se produce un cierre en anillo mediante la unión de dos residuos de cisteína, según la presente invención activa los canales iónicos epiteliales, lo que se detecta mediante el cambio en la tensión eléctrica frente a la intensidad de la corriente.

Para la simulación de una lesión pulmonar aguda y para la formación de un edema pulmonar, los pulmones de animales de experimentación, por ejemplo, ratones o ratas, se pueden enjuagar varias veces con una solución salina ácida de una manera habitual en el laboratorio (por ejemplo, según Isik F. et al., Eur J Cardiothorac Surg (2005); 28: 301-305). De esta manera, se produce una disminución de la función pulmonar. Si se inyecta ahora en los pulmones de los animales de experimentación una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, en donde, en cada caso, se encuentra un cierre en anillo mediante la unión de dos residuos de cisteína, según la presente invención, como niebla o en solución acuosa, se produce una clara mejora de la función pulmonar en el intervalo de 3 a 5 horas, indicado mediante el aumento del contenido de oxígeno en la sangre arterial.

Por tanto, una proteína según la presente invención, se puede usar para el tratamiento de edemas, tal como edemas pulmonares.

Se espera que una proteína según la presente invención, también se pueda emplear para el tratamiento de enfermedades adicionales, que están asociadas con la función pulmonar, por ejemplo, para la producción de un medicamento para el tratamiento de enfermedades que están asociadas con la función pulmonar.

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

- de la lesión pulmonar aguda (ALI, por sus siglas en inglés),
- del síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS, por sus siglas en inglés),
- del síndrome respiratorio agudo grave (SRAG),
- de neumonía,
- en insuficiencia multiorgánica,
- en lesiones pulmonares inducidas por la respiración, en trasplantes pulmonares, lesiones pulmonares asociadas a transfusiones, 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, tal como edemas pulmonares.

En otro aspecto, la presente invención proporciona una proteína según la presente invención para su uso en el tratamiento de edemas pulmonares, en donde se espera que una proteína según la presente invención además de

su uso para el tratamiento de edemas pulmonares también se pueda usar para el tratamiento de enfermedades adicionales que están asociadas con la función pulmonar, mediante la administración de una cantidad suficiente a un paciente, en necesidad de tal tratamiento.

Un paciente, como se usa en el presente documento, incluye mamíferos, por ejemplo, seres humanos.

Una proteína según la presente invención se puede administrar en forma de una composición farmacéutica.

En otro aspecto la presente invención proporciona una composición farmacéutica que se caracteriza en que comprende una proteína según la presente invención, por ejemplo, en combinación con al menos un adyuvante farmacéuticamente aceptable, tal como un vehículo o un diluyente, por ejemplo, un relleno, aglutinante, agentes que mejoran el flujo, lubricante, agente saborizante, azúcar o edulcorante, sustancias olorosas, conservantes, agentes estabilizadores, humectante, emulsionantes, agentes solubilizantes, sales para regular la presión osmótica y/o (mezclas de) tampones.

La cantidad adecuada de una proteína según la presente invención para el tratamiento de enfermedades naturalmente dependerá mucho de parámetros diferentes, por ejemplo, la naturaleza química y la farmacocinética de la proteína usada, del paciente individual, de la enfermedad que se va a tratar, del modo de empleo, pero una dosis diaria eficaz para mamíferos grandes incluye, por ejemplo, una cantidad de 0,0001 g hasta 1,5 g, por ejemplo de 0,001 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal.

El uso puede ser entérico o parenteral y es preferiblemente parenteral. Una composición farmacéutica según la presente invención se puede fabricar de una forma adecuada, por ejemplo análoga a un método conocido, por ejemplo, mediante procesos de mezcla, granulación, recubrimiento, disolución y liofilización.

Descripción de las figuras

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 mV; 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, imagen de la derecha, muestra la activación de los canales iónicos de sodio mediante una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1,

En las figuras 1A, 1B y 2A las proteínas son proteínas con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO. 1 o SEQ ID NO: 2, en donde, en cada caso, se produce un cierre en anillo a través de la unión entre dos residuos de cisteína,

detectado mediante patch clamp. La imagen izquierda en la figura 2A comparación sin proteína. Unidades: eje y: intensidad de la corriente en pA; eje x: tiempo en segundos.

La figura 2B, imagen de la derecha, muestra la activación de los canales iónicos de sodio mediante una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, detectado mediante patch clamp. La imagen izquierda en la figura 2B comparación sin proteína. Unidades: eje y: intensidad de la corriente en pA; eje x: tiempo en segundos.

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

La figura 3B muestra el aumento en el contenido de oxígeno en la sangre arterial después de la administración de una proteínas con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2. Unidades: eje y: contenido en oxígeno en %; eje x: tiempo de medición en minutos.

En los ejemplos se usan las siguientes abreviaturas:

Sal de TFA Sal del ácido trifluoroacético

Las proteínas aisladas con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 son proteínas cíclicas, en donde, en cada caso, se produce un cierre en anillo mediante la unión entre dos residuos de cisteína.

Ejemplo 1: Síntesis de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1

Se sintetizó una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc de forma completamente automatizada en los siguientes pasos:

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

La ciclación se produjo mediante la formación de un puente disulfuro entre las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína (posición 6) y cisteína (posición 20). Esto se realiza, por ejemplo, mediante la oxidación con oxígeno de los átomos de azufre en las cadenas laterales de la cisteína (posición 6) y la cisteína (posición 20) por lo que forma un puente disulfuro, lo que produce un cierre en anillo.

Posteriormente, se analizó la proteína por medio de HPLC reversa, por lo que se obtuvo el resultado, como se muestra en la figura 1A.

Ejemplo 2: Síntesis de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2

Se sintetizó una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 por medio de síntesis en fase sólida con Fmoc de forma completamente automatizada en los siguientes pasos:

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

La ciclación se produjo mediante la formación de un puente disulfuro entre las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína (posición 4) y cisteína (posición 18). Esto se realiza, por ejemplo, mediante la oxidación con oxígeno de los átomos de azufre en las cadenas laterales de la cisteína (posición 4) y la cisteína (posición 18) por lo que forma un puente disulfuro, lo que produce un cierre en anillo.

Posteriormente, se analizó la proteína por medio de HPLC reversa, por lo que obtuvo el resultado, como se muestra en la figura 1B.

Ejemplo 4: Cultivo de células

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron con células A549 humanas (No. de la ATTC CCL-185). Las células A549 son células epiteliales de pulmón humanas, que están implicadas en la difusión de agua y electrolitos en los pulmones.

Las células se resuspendieron en medio DMEM-F-12 con penicilina-estreptomicina al 1% y suero fetal de ternera al 10%, se transfirieron a recipientes de cultivo celular de plástico y se cultivaron en un incubador con aire al 95% y CO_2 al 5% a 37ºC. El medio se cambio de 2 a 3 veces por semana. Las células se duplican en aproximadamente 22 horas y no se superó una concentración celular de más de 7 x 10^4 células por cm^2.

Ejemplo 5: Activación de canales iónicos de células epiteliales humanas a través de proteínas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2

Se derivaron corrientes macroscópicas y corrientes de un único canal de células A549 en la configuración de “célula entera” y “unida a célula” de la técnica de patch clamp (Hamill et al, Pflugers Arch. 1981, 391(2):85-100., 1981). Para derivar la corriente en la configuración de “célula entera” se usaron las siguientes disoluciones de baño y electrodos:

Solución de baño: metanosulfonato de sodio 135 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,7 mM, CaCl2 1,8 mM, MgCl2 2 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4.

Solución de electrodos: metilsulfonato de potasio 120 mM, KCl 15 mM, NaCl 6 mM, Mg2ATP 1 mM, Na3ATP 2 mM, HEPES 10 mM y EGTA 0,5 mM (pH 7,2).

Se transfirieron cubreobjetos de vidrio con las células cultivadas en los mismos a un baño de prueba con capacidad de 1 ml, se fijaron en la mesa del microscopio (Axiovert 100, aumento de 400 veces) y las células se superfundieron

con la solución de baño descrita anteriormente. Después de ello, se derivó la corriente de una célula adecuada (que estaba adherida al cubreobjetos). Para ello, se colocó un microelectrodo relleno con una solución de electrolitos (un capilar de vidrio con una abertura en la punta definida, pulida con calor, de aproximadamente 1-3 µm, que corresponde a una resistencia de la punta del electrodo de 3-5 Ω) en la célula y la membrana se succionó, de modo que se formara un "sello de gigaohmio" entre la membrana y el electrodo, para minimizar la pérdida de corriente. En la configuración "unida a célula" se puede medir la corriente a través de canales iónicos individuales bajo la punta del electrodo. En la configuración de "célula entera" se atravesó la membrana bajo la punta del electrodo, de modo que se pudiera medir la corriente, que fluye a través de todos los canales iónicos de la célula. La derivación de las corrientes macroscópicas también se puede realizar con ayuda de la técnica de "patch clamp perforado". Para la derivación de la "célula entera" el se añadió ionóforo anfotericina a la solución de la pipeta, mediante lo cual la membrana se vuelve permeable bajo la abertura de la punta y se pueden derivar corrientes en la configuración de "célula entera". Al obtener un sello de gigaohmio se aplicó un potencial de retención de membrana a través de un preamplificador (CV-4 Headstagem Axon Instrument) y un amplificador (Axopatch 1D, Axon Instr.) y se midió la corriente que de esta manera fluía por los canales iónicos.

El protocolo de pulsos consiste en una hiperpolarización a -100 mV durante 1 segundo a un intervalo de 5 segundos. Como consecuencia adicional, se despolarizó por último la membrana hasta +100 mV en pasos de 20 mV. Este protocolo se realizó con la adición de proteínas sintéticas con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, así como con el inhibidor del canal de sodio amilorida. Las derivaciones de corrientes obtenidas de esta manera se almacenaron y se analizaron con ayuda del programa PCLAMP 6.0. Para ello se restaron las derivaciones de corriente obtenidas en presencia de amilorida, de las corrientes registradas anteriormente, de modo que se pudo determinar la corriente de sodio sensible a amilorida a través de los canales de sodio.

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

Ejemplo 6: Estudio animal experimental de edema pulmonar

Se anestesian ratas Wistar macho (con un peso de 250 g hasta 350 g) con Rompun® (0,02 ml/100 g) y Ketavet® (0,1 ml/100 g). La respiración se realiza con un ciclo de 72 impulsos/minuto, en un tiempo de inspiración de 0,2 segundos y un tiempo de espiración de 0,5 segundos. La temperatura corporal varía, de media, de 37ºC a 39ºC. En condiciones normales, la PaO2 (presión parcial de oxígeno arterial) varía de 500 a 550 mm de Hg. Para la simulación de una lesión pulmonar aguda y para la formación de un edema pulmonar se enjuagan los pulmones de 7 a 9 veces con solución salina ácida (pH 5).

Después de una hora, las proteínas con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 disueltas en solución salina estéril, en cada caso, se administran como niebla (volumen administrado máximo de 5 ml).

En un intervalo de 60 minutos respectivamente, se saca sangre arterial de los animales (0,1 ml) y se determina el contenido en oxígeno en % respecto al valor normal.

Después de 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 aumenta, como es evidente de la figura 3A o la figura 3B, véase también el ejemplo 7.

Ejemplo 7: Mejora de la función pulmonar.

La demostración del efecto estimulante de una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 según la presente invención sobre la función pulmonar se realiza por medios de estudios en animales experimentales, en los que se induce un edema pulmonar. El procedimiento experimental se describe en el ejemplo 6. Para la objetivación del valor de la medida se usaron en cada caso 5 animales.

Para la inhalación intratraqueal se disolvieron en cada caso 125 µg de proteína en solución de cloruro de sodio 150 mM pH 7,3. El contenido en oxígeno de la sangre arterial se mide inmediatamente antes del enjuague de los pulmones, 60 minutos después del enjuague de los pulmones y 180 minutos después del enjuague de los pulmones.

El contenido de oxígeno inmediatamente antes del enjuague de los pulmones se fija en el 100%. 60 minutos después del respectivo último enjuague de los pulmones el contenido de oxígeno en sangre representa, de media, solo el 20%. A las 3 horas el contenido porcentual de oxígeno aumenta a un valor del 60% en el tratamiento con una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 y al 63% en el tratamiento con una proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, respectivamente.

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

Los resultados se muestran 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.

REIVINDICACIONES

1. Proteína seleccionada de las secuencias de aminoácidos

SEQ ID NO: 1
(NH_2)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val(COOH); y

SEQ ID:NO: 2
(NH_2)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser(COOH),

en donde, en cada caso, se presenta un cierre en anillo mediante la unión entre dos residuos de cisteína.

2. Proteína según la reivindicación 1 en forma de una sal.

3. Proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, para su uso como medicamento.

4. Proteína según cualquiera de la reivindicaciones 1 a 3, para su uso en el tratamiento de edemas pulmonares.

5. Composición farmacéutica, **caracterizada en que** comprende una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2.

Fig. 1A

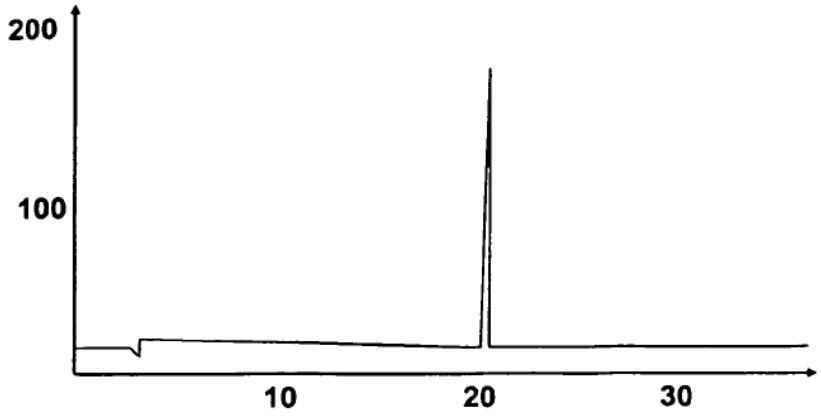

Fig. 1B

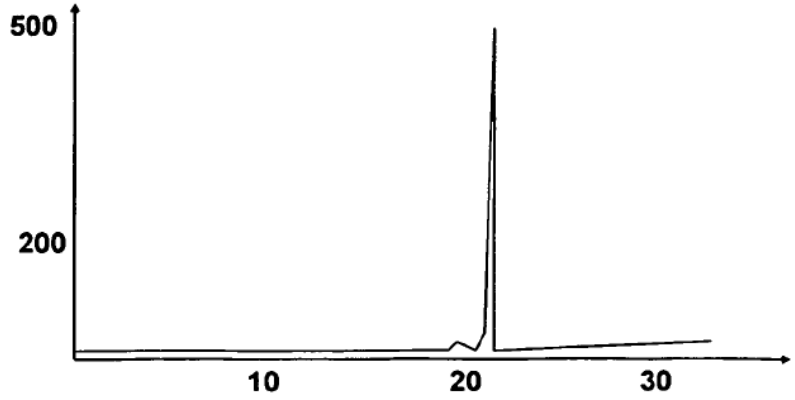

Fig. 2A

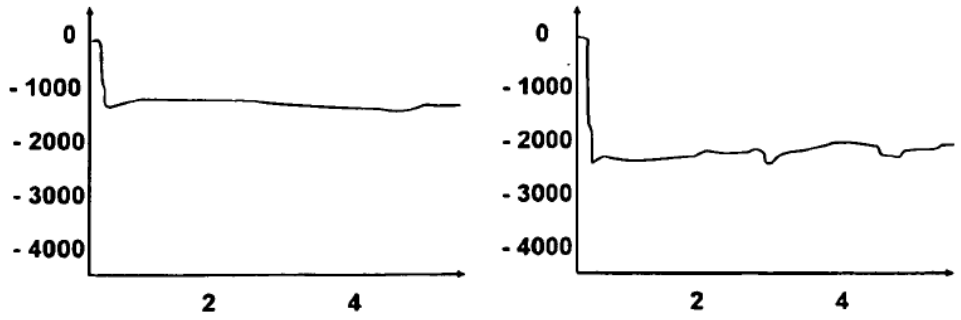
0
- 1000
- 2000
- 3000
- 4000
2
4
0
- 1000
- 2000
- 3000
- 4000
2
4

Fig. 2B

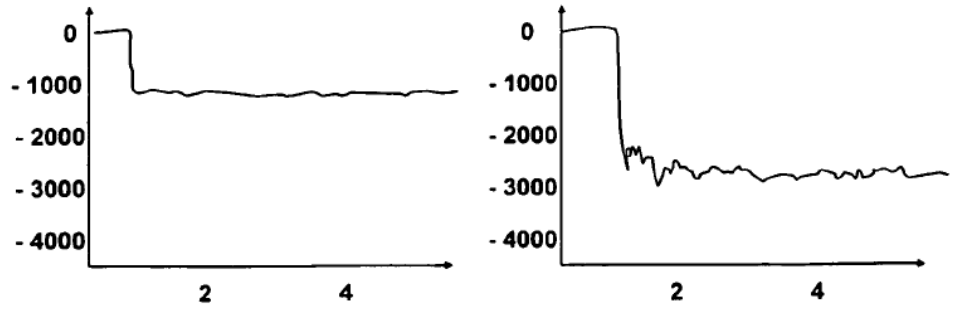
0
- 1000
- 2000
- 3000
- 4000
2
4
0
- 1000
- 2000
- 3000
- 4000
2
4

Fig. 3A

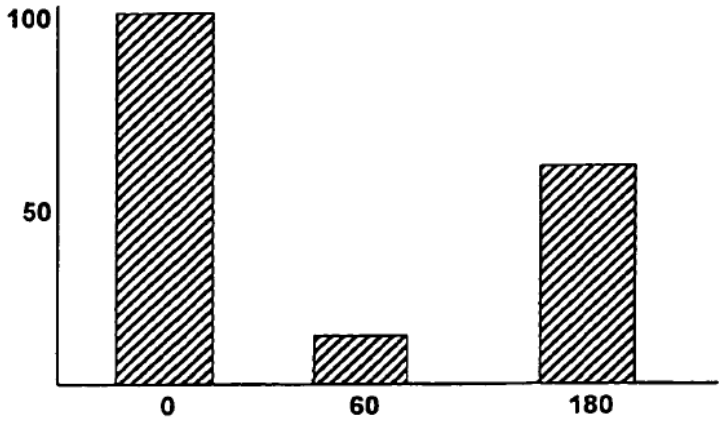
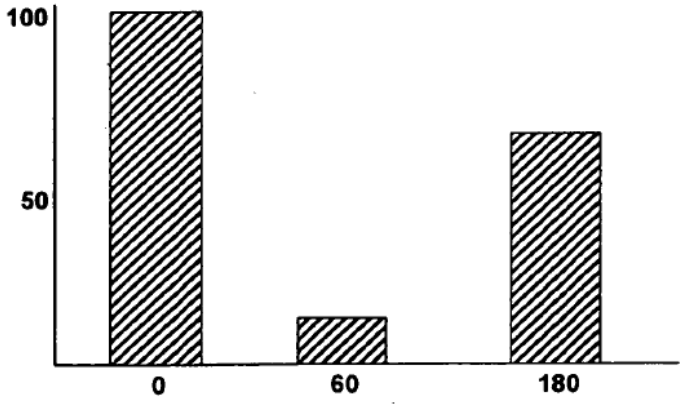
Fig 3B