(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 486 321**

(51) Int. CI.:

C07K 14/75 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2011 E 11732400 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.05.2014 EP 2582720**

(54) Título: **Péptidos como agentes activos para estabilizar barreras biológicas**

(30) Prioridad:

18.06.2010 AT 10102010

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.08.2014

(73) Titular/es:

XIBERSCIENCE GMBH (100.0%)
Josefigasse 24
2353 Guntramsdorf, AT

(72) Inventor/es:

PETZELBAUER, PETER y
REINGRUBER, SONJA

(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

Péptidos como agentes activos para estabilizar barreras biológicas

La presente invención se refiere a compuestos, en particular a péptidos que pueden estabilizar funciones de la barrera de epitelio y endotelio. Los péptidos y otros compuestos de la presente invención son útiles en el tratamiento y prevención de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial y endotelial. Enfermedades y trastornos particulares que van a tratarse y/o prevenirse con los péptidos u otros compuestos y usos proporcionados en el presente documento son quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Las Rho GTPasas controlan muchos aspectos del comportamiento de la célula tales como la organización del citoesqueleto, migración celular, progresión del ciclo celular, proliferación celular, diferenciación celular, expresión génica, supervivencia celular y apoptosis (Nature (2006), 440(7087):1069-1072; Drug Targets (2010), 11(9): 1043-1058). Un aspecto principal en su función es el control de la permeabilidad de superficies vasculares (Cardiovasc Res (2010), 87(2): 243-253; Thromb Haemost (2010), 103(1): 40-55; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005), 288(2): L294-L306) y epiteliales (Am J Pathol (2010), 177(2): 512-524; Physiology (Bethesda) (2010), 25(1): 16-26). Debido a su función central en la regulación de la permeabilidad, la activación de Rho GTPasas es decisiva para muchos procesos fisiopatológicos asociados a una rotura en la función de la barrera epitelial y endotelial. Tales procesos patológicos pueden ser trastornos y enfermedades que comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) (Med Sci Monit (2010), 16(4): 112-118; Microvasc Res (2009), 77(1): 39-45; Anesthesiology (2010), 113:1134-1143; Curr Pharm Des (2009), 15(27): 3108-3115; Mol Interventions (2004), 4(6): 349-357; Circ Res (2006), 98(3): 322-334; Am J Physiol Renal Physiol (2009), 297(2): F316-F326; Exp Cell Res (2011), 317(6): 859-872; Transl Res (2010), 155(1): 44-54; Burns (2003), 29(8): 820-827) o edema, particularmente enfermedades asociadas a edema de tejido progresivo (N Engl J Med (2010), 363: 689-691). Para el tratamiento de estas enfermedades, la inhibición farmacológica de Rho GTPasas y las posteriores Rho-cinasas es un enfoque prometedor (Trends Cell Biol (2008), 18: 210-219). Las estatinas y bisfosfonatos son sustancias que afectan la biosíntesis de isoprenoides y así previenen la modificación de lípidos de Rho GTPasas que son necesarias para su activación como se describe más adelante. Las estatinas y bisfosfonatos se prueban en estudios clínicos como productos farmacéuticos contra el cáncer y enfermedades cardíacas, además de para su capacidad para mejorar la función de la barrera vascular y epitelial alterada. Por ejemplo, fasudil es un inhibidor de Rho-cinasas que se usa en vasoespasmos de arterias cerebrales e hipertensión pulmonar. Además, se ha descrito que una proteína derivada de fibrina que se une a VE-cadherina, Bβ15-42, estabiliza barreras endoteliales mediante la inhibición de la Rho GTPasa RhoA (PloS ONE (2009), 4(4): e5391).

Debido a su función central en la biología celular, la actividad de Rho GTPasas está estrictamente controlada. Las Rho GTPasas van en ciclos entre un estado unido a GDP inactivo y un estado unido a GDP activo. Las Rho GTPasas pueden interaccionar con sus moléculas efectoras y afectar sus funciones solo en la forma unida a GTP. La mayoría de las GTPasas en forma activa están unidas a la membrana celular. Esta elección de membrana como diana está mediada por la región polibásica del extremo C y una isoprenilación postraduccional de las Rho GTPasas. La activa existe solo durante un tiempo limitado, ya que debido a la actividad de hidrólisis de Rho GTPasas la GTP unida se convierte rápidamente en GDP. El estado unido a GDP es más estable, por tanto, la parte importante de las Rho GTPasas celulares es inactiva. Los llamados inhibidores de la disociación de guanidina (GDI) enmascaran las secuencias que eligen membrana como diana de las Rho GTPasas y estabilizan la conformación unida a GDP. La activación de Rho GTPasas está mediada por factores de intercambio guanina-nucleótido (GEF) específicos, que catalizan el intercambio de GTP a GDP; véase también en el presente documento más adelante. Las GEF potencian la tasa de disociación de GDP y estabilizan la forma libre de nucleótido de Rho GTPasas. Como la GTP está presente en la célula en alto exceso molecular, la unión de GTP se favorece. La unión de GTP provoca un cambio conformacional de la Rho GTPasa de forma que se disocien GEF. El equilibrio entre Rho GTPasas activas e inactivas se regula adicionalmente por otro grupo de proteínas reguladoras, las proteínas activadoras de GTPasas (GAP). Las GAP aumentan la actividad de hidrólisis de Rho GTPasa intrínseca de las Rho GTPasas y, así favorecen su inactivación (Trend Cell Biol (2008), 18: 210-219). En su forma activa, las Rho GTPasas interaccionan con alta afinidad con uno de los varios efectos aguas abajo. El estado activo es muy transitorio; termina mediante la hidrólisis de GTP a GDP, una reacción que se estimula por GAP. Además, los factores de disociación de guanina nucleótido estabilizan la forma inactiva de Rho GTPasas (Genes Dev. 1997; 11: 2295-2322; Biochem Soc Trans (2005); 33: 891-895; Cell (2004); 116: 167-179).

Una posibilidad de controlar la actividad de Rho GTPasa específica para contexto es mediante factores de intercambio de guanina-nucleótido (GEF). Los GEF son reguladores en aguas arriba de la actividad de Rho GTPasa. Los GEF controlan la actividad de Rho GTPasa de un modo espacio-temporal y parcialmente específico del contexto (Nature Cell Biol (2011), 13: 159-166). En otras palabras, los GEF permiten la activación de Rho en un tiempo definido y localización dentro de una célula dada. Integran y procesan múltiples señales externas y están por sí mismas estrictamente controladas. Actúan

como superficies de separación que enlazan señales entrantes con ciertas respuestas biológicas de células activadas por Rho GTPasa (Trends Cell Biol 2008; 18:210-19). Las características reguladoras de GEF son debidas a su arquitectura multidomonio. La primera Rho GEF se aisló de células de linfoma como gen transformado y se llamó Dbl (Nat Rev Mol Cell Biol (2005), 6(2): 167-180). Mientras tanto, la familia de homología de Dbl comprende más de 70 proteínas. La mayoría de los GEF contienen un dominio de homología altamente conservado de aproximadamente 200 aminoácidos que media en el intercambio de GDP y GTP en Rho GTPasas. Este dominio se designa el dominio DH. La especificidad de GEF por una única GTPasa o grupo de GTPasas se confiere por este dominio DH. El dominio del extremo N es autoinhibidor, es decir, en el estado inactivo el extremo N está fosforilado e interacciona con el dominio DH. Tras la desfosforilación, la auto-inhibición se resuelve (Trend Cell Biol (2008), 18: 210-219; Protein Sci (2011), 20: 107-111). Adicionalmente, hay una segunda subfamilia de GEF que comprende 11 miembros que no lleva un dominio DH. En lugar de un dominio DH contiene dos regiones de homología, concretamente DHR1 y DHR2 (región de homología de enlace 1 y 2) (Trends Cell Biol (2008), 18: 210-219; J Cell Sci (2005), 118: 4937-4946; Nat Rev Mol Cell Biol (2005), 6(2): 167-180). El GEF se une a las Rho GTPasas mediante su(s) dominio(s) de homología y así ayudan en el intercambio de GDP con GTP.

Los GEF comprenden un dominio de pleckstrina (dominio PH) próximo al dominio DH. El dominio PH participa en la actividad catalítica y mediación de la interacción proteína-proteína. Juntos, el dominio DH y PH proporcionan la estructura mínima que se requiere para la activación de GTPasa. El dominio PH participa en la distribución subcelular de GEF y en regular la actividad (Genes Dev (2002), 16: 1587-1609; Nat Rev Mol Cell Biol (2005), 6(2): 167-180). Por ejemplo, GEF-H1 es inactivo cuando está asociado con microtúbulos y uniones estrechas. En el estado activo, GEF-H1 se reubica en el citoplasma (Mol Biol Cell (2008), 19(5): 2147-2153; Dev Cell (2005), 8: 777-786).

La actividad de GEF está controlada por la inhibición intramolecular. El dominio del extremo N de GEF sirve de auto-inhibidor en el que la interacción intramolecular se neutraliza por fosforilación. Así, la GTPasa diana puede interaccionar con el dominio DH. La elección como diana de Rho GEF en regiones subcelulares específicas también es un mecanismo de control importante de la actividad de GEF. Por ejemplo, GEF-H1 inactivo está asociado con microtúbulos en los que está unido a la membrana interna. En un estado activo, GEF-H1 se disocia y relocaliza en el citoplasma (Trends in Cell Biol (2008), 18: 210-219).

Las rutas de GEF/Rho GTPasas regulan varios procesos biológicos celulares centrales tales como la organización del citoesqueleto, expresión génica, progresión del ciclo celular y diferenciación celular, además de procedimientos apoptósicos y no apoptósicos y motilidad celular, presentación de antígenos, permeabilidad epitelial y endotelial (Cardiovasc Res (2010), 87(2): 243-253; Thromb Haemost (2010), 103(1): 40-55; Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2005), 288(2): L294-L306; Am J Pathol (2010), 177(2): 512-524; Physiology (Bethesda) (2010), 25(1): 16-26). Debido a su función central en la fisiología celular, la desregulación de las rutas de GEF/Rho GTPasa es un componente importante de la transducción de señales fisiopatológicas en enfermedades inflamatorias, disfunción de la barrera endotelial y epitelial y cáncer.

La ruta de GEF-H1/RhoA activa el aparato contráctil celular que consiste en actina y miosina y se requiere para la disociación de la unión (Mol Biol Cell (2007), 18: 3429-3439). En cambio, la activación de RhoA inducida por p114RhoGEF se requiere para el ensamblaje de unión estrecha (Nat Cell Biol (2011), 13(2): 159-166). Una regulación específica para sitio y contexto de RhoA es decisiva para el mantenimiento de las barreras fisiológicas tales como capas epiteliales y endoteliales. Las células endoteliales y epiteliales forman capas continuas que revisten la luz interna de los vasos sanguíneos o las cavidades viscerales, respectivamente. Forman barreras semipermeables y regulan el intercambio de fluido y nutrientes de tejidos vecinos. Una actividad de RhoA equilibrada es esencial para la función de la barrera epitelial y endotelial fisiológica. Células endoteliales y epiteliales quiescentes muestran una actividad de RhoA basal, las fibras de actina y haces de miosina están limitadas a las fronteras de la célula para estabilizar el tejido (Endothelial Biomedicine, Cambridge Press (2007), 696-706; J Cell Biol (1996), 133: 1403-1415). La estimulación con agentes pro-inflamatorios o pro-trombóticos produce la activación de la ruta de GEF/RhoA que a su vez induce activación citoesquelética (J Cell Biol (1996), 133: 1403-1415). La actina y miosina forman haces contráctiles que penetran en las células, como resultado las células se estrechan, las células vecinas relajan su contacto. La abertura de la frontera célula-célula es un proceso fisiológico importante, por ejemplo, en proliferación de tejido y procesos inflamatorios para facilitar la migración de células inflamatorias. Pero la activación en exceso de GEF/RhoA anómala produce la rotura de barreras epiteliales y/o endoteliales y es un contribuyente importante a la fisiopatología de muchas enfermedades graves (Adv Drug Deliv Rev (2000), 41: 329-40; Ann NY Acad Sci (2008), 1123: 134-45; Trends Cell Biol (2008), 18: 210-219) Por ejemplo, la inhibición de GEF-H1 previene la lesión pulmonar aguda (LPA) producida por ventilación mecánica en un modelo de ratón (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2010), 298(6): L837-L848).

La lesión pulmonar aguda (LPA) es una afección grave definida por infiltrados pulmonares bilaterales e hipoxia (N Engl J Med (2005), 353(16): 1736-8; Am J Resp Crit Care Med (1994), 149: 818-824). El síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) es una forma grave de la LPA. Con una tasa de incidencia de 79 por 100.000 y una mortalidad del 40 %, la LPA es un problema importante en las unidades de cuidado intensivo (UCI). La LPA tanto se induce por el impacto sobre el pulmón (tal como neumonía, aspiración ácida, inhalación de humo, ventilación mecánica) como se desarrolla como

secuela de septicemia y traumatismo. Aún cuando la LPA se desarrolla a partir de diferentes etiologías, todos los pacientes muestran síntomas comunes tales como edema rico en proteínas e infiltración de células inflamatorias en el pulmón (N Engl J Med (2000); 342(18): 1334-1349; Am J Respir Cel Mol Biol (2005), 33(4): 319-327). Un modelo de inhalación de LPS en roedores se usa ampliamente en la búsqueda de posibilidades de intervención terapéutica en LPA. La inhalación de LPS induce un edema rico en proteínas e inflamación celular debida a una rotura de barreras endoteliales y epiteliales (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2008), 295(3): L379-L399; Jama (2003), 289(16): 2104-2112; Nature (2005), 436: 112-116). La inhibición de GEF-H1 reduce la lesión pulmonar en un modelo de ratón de lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR) (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2010), 298(6): L837-L848) y mejora la disfunción de la barrera endotelial (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2006), 290(3): L540-L548).

Quemaduras cutáneas importantes (térmicas y químicas) que alcanzan más del 15 % del área superficial corporal total no solo se producen en lesión de tejido localizado, sino también en inflamaciones sistémicas amplias tales como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) causando lesión distal del sistema de órganos al sitio de quemadura. El SRIS también incluye edema, hiperpermeabilidad microvascular, choque hipovolémico e insuficiencia multiorgánica (síndrome de disfunción orgánica múltiple) y SDRA (J Am Coll Surg (2001), 192: 241-254). Uno de los efectos más dañinos de las lesiones por quemadura es la inflamación sistémica que alcanza el pico en el plazo de las 3 primeras horas después de la incidencia y disminuye durante las siguientes 24-48 h (Clin Plast Surg (2000), 27: 11-22; World J Surg (1992), 16: 2-9).

El número de estudios que investigan la función de rutas de GEF/RhoA en la fisiopatología de trastornos tales como quemaduras importantes es muy limitado. Pero hay estudios que sugieren una contribución de cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) y Rho cinasa al desarrollo de SRIS y extravasación capilar después de quemaduras. Ambas moléculas, MLCK y Rho cinasa, son efectores aguas abajo de RhoA. Se muestra que las células endoteliales pierden su función de barrera tras la re-incubación con plasma aislado de ratas con quemaduras. La hiperpermeabilidad endotelial puede invertirse tratando las células endoteliales con un inhibidor de MLCK (AM J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2004), 286: L841-L847). La inhibición farmacológica de MLCK después de lesión por escaldado mejora el resultado *in vivo* (Shock (2003), 20: 363-368). Una inactivación de MLCK-210 en ratones reduce la extravasación capilar y mejora la supervivencia en un modelo de ratón de quemaduras (Shock (2007), 28: 589-595). La inhibición de Rho cinasa disminuye la extravasación vascular después de lesión por escaldado *in vivo* (Burns (2003), 29(8): 820-827).

Por consiguiente, el disminuir la actividad de Rho GTPasa puede ser una estrategia útil en tratar trastornos y enfermedades asociados a alta actividad de Rho GTPasas. Cuando se tiene como objetivo inhibir la función de GEF para disminuir Rho GTPasas, la cuestión principal es lograr la especificidad en tiempo y localización y elegir como diana sitios de interacción proteína diana-proteína. Sin embargo, la compleja naturaleza de estos sitios de interacción todavía no se entiende completamente. En realidad, los inhibidores de Rho GTPasa y Rho-cinasa conocidos actúan sistémicamente, es decir, influyen en Rho-GTPasas y Rho-cinasas, también en células/tejido sano y así pueden implicar graves efectos secundarios tales como miopatía tóxica (para estatinas) y pueden producir hipotensión (fasudil) (Surg Neurol (2007), 68(2): 126-131). Además, las estatinas tienen que suministrarse como un tratamiento profiláctico, es decir, se requiere tratamiento prehospitalario (Crit Care Med (2011), 39(6): 1343-1350.). Esto también se aplica para fasudil en el que se requirió pretratamiento en modelos animales (Life Sci (2011), 88(1-2): 104-109).

Por tanto, existe la necesidad de inhibidores específicos de Rho GTPasa.

Este problema técnico se ha resuelto por las realizaciones proporcionadas en el presente documento y como se proporcionan en los ejemplos adjuntos y en las reivindicaciones.

La invención se refiere a las realizaciones como se definen en las reivindicaciones. Así, la invención se caracteriza por los siguientes puntos.

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos

$GX_1RPX_2X_3X_4\ X_5GGX_6$ (SEC ID Nº: 1)

en la que

X_1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R y A;

X_2 tanto se omite como es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L y V;

X_3 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos;

X_4 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en GG;

X_5 representa dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, I y S; y

X_6 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos.

2. El péptido del punto 1 que puede inhibir la actividad de una Rho GTPasa.

3. El péptido del punto 1 o 2, en el que X_1 es R.

4. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que X_2 es L o V.

5. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que X_3 es PPP.

6. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 5, en el que X_4 es GG.

7. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 6, en el que X_5 es IS o AS.

8. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que X_6 se omite.

9. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 8, en el que X_1 es R, X_2 es L, X_3 se omite, X_5 es IS y X_6 se omite, o en el que X_1 es R, X_2 es V, X_3 se omite, X_5 es IS y X_6 se omite.

10. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 9, en el que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3);

GRRPVGGISGG (SEC ID Nº: 6);

GRRPLISGG (SEC ID Nº: 4);

GRRPVISGG (SEC ID Nº: 7);

GRRPLPPPISGG (SEC ID Nº: 8);

GRRPVPPPISGG (SEC ID Nº: 9);

GRRPLGGAAGG (SEC ID Nº: 10);

GRRPVGGAAGG (SEC ID Nº: 11);

GRRPLPPPAAGG (SEC ID Nº: 12);

GRRPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 13);

GRRPLGGASGG (SEC ID Nº: 14);

GRRPVGGASGG (SEC ID Nº: 15);

GRRPLPPPASGG (SEC ID Nº: 16);

GRRPVPPPASGG (SEC ID Nº: 17);

GRRPLGGIAGG (SEC ID Nº: 18);

GRRPVGGIAGG (SEC ID Nº: 19);

GRRPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 20);

GRRPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 21);

GARPLGGISGG (SEC ID Nº: 22);

GARPVGGISGG (SEC ID Nº: 23);

GARPLPPPISGG (SEC ID Nº: 24);

GARPVPPPISGG (SEC ID Nº: 25);

GARPLGGAAGG (SEC ID Nº: 26);

GARPVGGAAGG (SEC ID Nº: 27);

GARPLPPPAAGG (SEC ID Nº: 28);

GARPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 29);

GARPLGGASGG (SEC ID Nº: 30);

GARPVGGASGG (SEC ID Nº: 31);

GARPLPPPASGG (SEC ID Nº: 32);

GARPVPPPASGG (SEC ID Nº: 33);

GARPLGGIAGG (SEC ID Nº: 34);

GARPVGGIAGG (SEC ID Nº: 35);

GARPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 36); y

GARPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 37).

11. Un polinucleótido que codifica el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 10.

12. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 10 o el polinucleótido del punto 11 para su uso como una sustancia farmacéutica.

13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 10 o 12 y/o el polinucleótido del punto 11 o 12, que opcionalmente comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

14. El péptido de uno cualquiera de los puntos 1 a 10 o 12, el polinucleótido del punto 11 o 12 o la composición farmacéutica del punto 13 para su uso en el tratamiento de o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial, en el que dicha enfermedad o trastorno está seleccionado del grupo que consiste en lesión pulmonar aguda (LPA), lesión renal aguda (LRA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), septicemia, quemaduras, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y edema.

15. El péptido del punto 12 o 14, el polinucleótido del punto 12 o 14 o la composición farmacéutica del punto 13 o 14, en el que la vía de administración es parenteral u oral.

En el presente documento se describen y se proporcionan péptidos que comprenden o que consisten en la secuencia de aminoácidos

$GX_1RPX_2X_3X_4X_5GGX_6$ (SEC ID Nº: 1)

en la que

X_1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R y A;

X_2 tanto se omite como es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L y V;

X_3 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos;

X_4 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en GG;

X_5 representa dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, I y S; y

X_6 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos.

En ciertas circunstancias, X_6 también puede comprender o consistir en más de 5 aminoácidos como se describe en el presente documento más adelante.

Los péptidos de la presente divulgación comprenden o consisten preferentemente en no más de 19 aminoácidos, más preferentemente no más de 14 aminoácidos, lo más preferentemente no más de 11 aminoácidos o no más de 9 aminoácidos. En una realización, el péptido de la presente divulgación comprende o consiste en 11 aminoácidos.

Como se usa en el presente documento, el término “aminoácido” se refiere a cualquier aminoácido conocido en la técnica y comprende aminoácidos proteinogénicos, además de no proteinogénicos, como se conocen en la técnica. Los aminoácidos proteinogénicos comprenden alanina (Ala; A), arginina (Arg; R), asparagina (Asn; N), ácido aspártico (Asp; D), cisteína (Cys; C), glutamina (Gln; Q), ácido glutámico (Glu; E), glicina (Gly; G), histidina (His; H), isoleucina (Ile; I), leucina (Leu; L), lisina (Lys; K), metionina (Met; M), fenilalanina (Phe; F), prolina (Pro; P), serina (Ser; S), treonina (Thr; T),

triptófano (Trp; W), tirosina (Tyr; Y), valina (Val; V), selenocisteína (Sec; U) y pirrolisina (Pyl; O). Ejemplos no limitantes de aminoácidos no proteinogénicos son hidroxiprolina, selenometionina, carnitina, ácido gamma-aminobutírico (GABA), lantionina, deshidroalanina, ornitina o citrulina. Como el experto sabe, es posible que en algunos casos los aminoácidos no proteinogénicos también puedan ser parte de proteínas. Los aminoácidos se abrevian en el presente documento por el código de una letra o el código de tres letras comúnmente usados en la materia y como también se expone anteriormente en este documento.

Como se ha encontrado sorprendentemente en el contexto de la presente invención, los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento pueden inhibir GTPasas. Esto se ha demostrado a modo de ejemplo en los ejemplos adjuntos para RhoA. Particularmente, como se describe y ejemplifica en el presente documento, estos péptidos son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos producidos por una activación anómala de Rho GTPasas. Tales enfermedades y trastornos comprenden, entre otros, enfermedades inflamatorias que están relacionadas con una pérdida de función de la barrera endotelial y/o epitelial. Por ejemplo, se mostró que los péptidos de la presente invención reducían la inflamación pulmonar que se correlaciona con menos lesión pulmonar y reduce el edema pulmonar; véase la Figura 1. La rotura de barreras endoteliales y/o epiteliales es un componente importante de la fisiopatología de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Las enfermedades o trastornos que son tratables o prevenibles por los medios y procedimientos inventivos comprenden particularmente quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema. Como ya se ha mencionado, según la presente invención, el SRIS también comprende edema, hiperpermeabilidad microvascular y choque hipovolémico. En contexto con la presente invención, los edemas que son tratables y/o prevenibles por los medios y procedimiento como se proporcionan en el presente documento pueden ser particularmente enfermedades asociadas a edema de tejido progresivo como se conoce en la técnica y como se describe, por ejemplo, en N Engl J Med (2010), 363: 689-691. Los péptidos proporcionados en el presente documento actúan mediante su capacidad para estabilizar barreras endoteliales y epiteliales, reducir la formación e inflamación de edema, mejorándose así la función del órgano. Por consiguiente, los medios y procedimientos descritos y proporcionados en el presente documento son particularmente útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. En particular, los péptidos y procedimientos de la presente divulgación son útiles en el tratamiento y/o prevención de quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Los péptidos descritos y proporcionados en la presente invención se derivan de cingulina, un inhibidor de GEF-H1 conocido (NY Acad Sci (2009), 1165: 88-98; Dev Cell (2005), 8: 777-786; Dev Cell (2007), 12: 699-712).

Además, los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento muestran similitud de secuencias con la proteína de unión a VE-cadherina e inhibidora de RhoA Bβ15-42 (PLoS ONE (2009), 4(4): e5391). La actividad de Bβ15-42 se ha descrito repetidamente como que depende fuertemente de los cuatro primeros aminoácidos (Int J Cancer (2009), 125: 577-584). Particularmente, se ha descrito que His_{16} (2ª posición de Bβ15-42) y Arg_{17} (3ª posición de Bβ15-42) de Bβ15-42 son críticos (Biochemistry (2002), 41: 4107-4116) para la funcionalidad de Bβ15-42. A diferencia de esto, los péptidos descritos y proporcionados en la presente invención no tienen una His en la 2ª posición, pero sin embargo se muestra que tienen fuertes efectos inhibidores de RhoA. Por tanto, los péptidos descritos en el presente documento eligen como diana células endoteliales, además de epiteliales, careciendo las últimas de VE-cadherina. Además, se ha descubierto de manera sorprendente en la presente invención que los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento son significativamente más eficaces que Bβ15-42 como se ha demostrado a modo de ejemplo usando un modelo animal para LPA (véase, por ejemplo, el Ejemplo 6).

Los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento pueden comprender además X_7 en el extremo C, en el que X_7 es un resto que es adecuado para retardar la filtración renal primaria, para prolongar la semivida en suero y/o para proteger contra la degradación proteolítica (particularmente peptidasas) de los péptidos proporcionados en el presente documento. Tales restos se conocen en la técnica. Ejemplos no limitantes de tales restos son NH_2, albúmina, polietilenglicol, dextrano, ferritina, hidroxietilalmidón y el resto Fc de un anticuerpo. X_7 también puede ser o comprender un estiramiento de aminoácidos que puede prolongar la semivida en suero como se describe en, por ejemplo, el documento WO 08/155134 o secuencias de aminoácidos como se describen en el documento WO 07/103515 o en Nat Biotechnol (2009), 27: 1186-1190.

A continuación se describen ejemplos no limitantes de las variables X_1 a X_6 de la secuencia general de los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento. Los péptidos de la presente divulgación pueden comprender uno de los siguientes ejemplos específicos de las variables o una combinación de dos, tres o más de los mismos. X_1 es, por ejemplo, R. X_2 puede ser L o a V, por ejemplo, L. X_3 puede omitirse o PPP, por ejemplo, omitirse. X_4 puede ser GG. X_5 puede ser IS o AS, por ejemplo, IS. X_6 puede omitirse o puede ser un aminoácido adicional o estiramiento de aminoácidos. Dichos 1 a 5 aminoácidos de X_6 pueden seleccionarse de cualquier aminoácido como se describe en el

presente documento.

Además, en ciertas circunstancias, X_6 puede comprender o consistir en más de 5 aminoácidos. También se prevé que X_6 pueda comprender un estiramiento de aminoácidos más largo, incluso un estiramiento de aminoácidos más largo de 15 aminoácidos. Tal estiramiento también puede comprender un estiramiento de aminoácidos que prolonga la semivida en suero como se describe para X_7 anteriormente, como las secuencias "PAS" proporcionadas en el documento WO 08/155134, o las secuencias de péptidos proporcionadas en el documento WO 07/103515 o en Nat Biotechnol (2009), 27: 1186-1190. Sin embargo, X_6 también puede omitirse. En una realización, el péptido de la presente divulgación comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GRRPLX$_4$ISGG (SEC ID Nº: 2), por ejemplo, GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3) o GRRPLISGG (SEC ID Nº: 4). En otra realización, el péptido de la presente divulgación comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GRRPVX$_4$ISGG (SEC ID Nº: 5), por ejemplo, GRRPVGGISGG (SEC ID Nº: 6) o GRRPVISGG (SEC ID Nº: 7). En una realización particular, el péptido de la presente divulgación comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3).

La presente divulgación se refiere a los siguientes ejemplos específicos no limitantes para los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento. En particular, los péptidos pueden comprender o consistir en una cualquiera de las siguientes secuencias:

GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3);

GRRPVGGISGG (SEC ID Nº: 6);

GRRPLISGG (SEC ID Nº: 4);

GRRPVISGG (SEC ID Nº: 7);

GRRPLPPPISGG (SEC ID Nº: 8);

GRRPVPPPISGG (SEC ID Nº: 9);

GRRPLGGAAGG (SEC ID Nº: 10);

GRRPVGGAAGG (SEC ID Nº: 11);

GRRPLPPPAAGG (SEC ID Nº: 12);

GRRPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 13);

GRRPLGGASGG (SEC ID Nº: 14);

GRRPVGGASGG (SEC ID Nº: 15);

GRRPLPPPASGG (SEC ID Nº: 16);

GRRPVPPPASGG (SEC ID Nº: 17);

GRRPLGGIAGG (SEC ID Nº: 18);

GRRPVGGIAGG (SEC ID Nº: 19);

GRRPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 20);

GRRPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 21);

GARPLGGISGG (SEC ID Nº: 22);

GARPVGGISGG (SEC ID Nº: 23);

GARPLPPPISGG (SEC ID Nº: 24);

GARPVPPPISGG (SEC ID Nº: 25);

GARPLGGAAGG (SEC ID Nº: 26);

GARPVGGAAGG (SEC ID Nº: 27);

GARPLPPPAAGG (SEC ID Nº:28)

GARPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 29);

GARPLGGASGG (SEC ID Nº: 30);

GARPVGGASGG (SEC ID Nº: 31);

GARPLPPPASGG (SEC ID Nº: 32);

GARPVPPPASGG (SEC ID Nº: 33);

GARPLGGIAGG (SEC ID Nº: 34);

GARPVGGIAGG (SEC ID Nº: 35);

GARPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 36); o

GARPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 37).

Como ya se ha mencionado, según la presente divulgación, un péptido que comprende o que consiste en una cualquiera de las secuencias particulares anteriores puede comprender además un resto X_7 en el extremo C como se define en el presente documento.

Los procedimientos para sintetizar péptidos son conocidos en la materia y comprenden, por ejemplo, síntesis de FMOC convencional como se describe en la bibliografía (por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida - "A practical approach" por E. Atherton, R.C. Sheppard, Oxford University press 1989) o síntesis en fase líquida, en la que los péptidos se ensamblan usando una estrategia mixta por química de BOC y condensación de fragmentos como se describe en la bibliografía (E. Wünsch, "Synthese von Peptiden" en "Methoden der organischen Chemie" (Houben-Weyl), 15 Ausg. 4, Teil 1 und 2 Thieme, Stuttgart, 1974).

Los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento pueden ser capaces de inhibir la actividad de una Rho GTPasa, por ejemplo, RhoA. Los procedimientos para evaluar la actividad de Rho GTPasa se conocen en la técnica y se describen y ejemplifican en el presente documento. Ejemplos no limitantes de procedimientos adecuados para evaluar la actividad de Rho GTPasa incluyen la determinación de la actividad global de Rho GTPasa como se describe en J Biol Chem (2004), 279: 7169-7179. Un ensayo tal puede realizarse usando sustratos de Rho (por ejemplo, rotekina) marcados con GST que se mezclan en lisados celulares, seguido de una captura usando anticuerpos anti-GST. La detección puede llevarse a cabo por electroforesis en gel y transferencia Western usando anticuerpos anti-Rho como se conoce en la técnica. Otro procedimiento adecuado que evalúa la actividad de Rho GTPasa es un ensayo de G-LISA como se describe en Basic Res Cardiol (2009), 104: 333-340. Todavía otra forma para evaluar la actividad de Rho GTPasa puede ser la determinación de la activación de Rho espacio-temporal de sitio dentro de una célula dada usando biosensores de activación de Rho GTPasa tales como sensores efectores de GFP o sensores de FRET unimoleculares o bimoleculares transfectados o recombinantemente expresados en una célula dada. Estos biosensores permiten la obtención de imágenes espacio-temporales *in vivo* de Rho GTPasas activas individuales (J Cell Science (2010), 123: 1841-1850). Por tanto, kits comerciales para evaluar la actividad de Rho GTPasa están disponibles tales como, por ejemplo, "RhoGEF Exchange Assay Biochem Kit" de Cytoskeleton, Inc. Por ejemplo, un péptido dado puede considerarse un péptido de la presente divulgación (1) si comprende o consiste en una secuencia como se define en el presente documento, y (2) si disminuye la actividad de Rho GTPasa (por ejemplo, RhoA) de una célula de prueba al menos 1,5 veces, al menos 2 veces, al menos 2,5 veces o al menos 3 veces en comparación con la actividad de Rho GTPasa respectiva (por ejemplo, RhoA) de una célula de referencia (que pertenece a la misma línea celular) no tratada con el péptido.

La presente invención también se refiere a polinucleótidos que codifican los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento. Estos polinucleótidos pueden ser análogos de ácido nucleico tales como, por ejemplo, moléculas de ADN, moléculas de ARN, tiofosfatos de oligonucleótidos, ribo-oligonucleótidos sustituidos, moléculas de LNA, moléculas de PNA, GNA (ácido glicolnucleico) moléculas, moléculas de TNA (ácido treosanucleico) o polinucleótidos de morfolino. Además, el término "polinucleótido" debe interpretarse equivalentemente con el término "molécula de ácido nucleico" en contexto con la presente invención y puede referirse, entre otros, a ADN, ARN, PNA o LNA o híbridos de los mismos, o a cualquier modificación de los mismos que se conoce en la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5.525.711, US 4.711.955, US 5.792.608 o EP 302175, por ejemplos, de modificaciones). Residuos de ácidos nucleicos comprendidos por los polinucleótidos descritos y proporcionados en el presente documento pueden ser residuos de ácidos nucleicos que se producen naturalmente o residuos de ácidos nucleicos artificialmente producidos. Ejemplos de residuos de ácidos nucleicos son adenina (A), guanina (G), citosina (C), timina (T), uracilo (U), xantina (X) e hipoxantina (HX). Como se entiende por el experto en la materia, puede usarse timina (T) y uracilo (U) indistintamente dependiendo del tipo respectivo de polinucleótido. Por ejemplo, como el experto sabe, una timina (T) como parte de un ADN se corresponde con un uracilo (U) como parte de los ARNm transcritos correspondientes. Los polinucleótidos descritos y proporcionados en el presente documento pueden ser mono o bicatenarios, lineales o circulares, naturales o sintéticos.

Además, según la presente divulgación, los polinucleótidos descritos en y proporcionados en el presente documento pueden clonarse en un vector. Así, la presente divulgación también se refiere a un vector que comprende el polinucleótido como se describe y proporciona en el presente documento. El término "vector" como se usa en el presente documento se refiere particularmente a plásmidos, cósmidos, virus, bacteriófagos y otros vectores comúnmente usados en ingeniería genética. En una realización preferida, estos vectores son adecuados para la transformación de células como células fúngicas, células de microorganismos tales como levadura o células procariotas. En una realización particularmente preferida, tales vectores son adecuados para la transformación estable de células bacterianas, por ejemplo, para expresar los polinucleótidos de la presente invención.

Por consiguiente, en un aspecto de la divulgación, el vector como se proporciona es un vector de expresión. Generalmente, los vectores de expresión se han descrito ampliamente en la bibliografía. Como regla, pueden no solo contener un gen marcador de selección y una replicación que asegura el origen de replicación en el huésped seleccionado, sino también un promotor, y en la mayoría de los casos una señal de terminación para la transcripción. Entre un promotor y la señal de terminación hay preferentemente al menos un sitio de restricción o un poliligador que permite la inserción de una secuencia de ácidos nucleicos/molécula que se desea expresar.

Debe entenderse que cuando el vector descrito y proporcionado en el presente documento se genera sacando ventaja de un vector de expresión conocido en la técnica anterior que ya comprende un promotor adecuado que va a emplearse en el contexto de la presente divulgación, por ejemplo, la expresión de un polinucleótido como se describe anteriormente en este documento, la construcción de ácidos nucleicos se inserta en ese vector de modo que el vector resultante comprenda solo un promotor adecuado que va a emplearse en el contexto de la presente divulgación. El experto sabe cómo puede ponerse en práctica tal inserción. Por ejemplo, un promotor puede escindirse tanto de la construcción de ácidos nucleicos como del vector de expresión antes de la ligación.

Ejemplos no limitantes del vector en el que se clona un polinucleótido descrito y proporcionado en el presente documento son vectores adenovíricos, víricos adenoasociados (AAV), lentivíricos, lentivíricos basados en el VIH o minicirculares no víricos. Otros ejemplos de vectores adecuados para comprender el polinucleótido de la presente invención para formar el vector descrito en el presente documento se conocen en la técnica y son, por ejemplo, otros vectores para sistemas de expresión bacterianos y eucariotas.

Además, en el contexto de la presente divulgación, los polinucleótidos y/o el vector descrito y proporcionado en el presente documento pueden transducirse, transformarse o transfectarse o introducirse de otro modo en una célula huésped. Así, la presente divulgación también se refiere a una célula huésped que comprende el polinucleótido y/o el vector como se describe y proporciona en el presente documento. Por ejemplo, la célula huésped es una célula procariota, por ejemplo, una célula bacteriana. Como ejemplo no limitante, la célula huésped también puede ser una célula de mamífero. La célula huésped descrita en el presente documento pretende ser particularmente útil para generar los péptidos descritos y proporcionados en el presente documento. Generalmente, la célula huésped descrita en el presente documento puede ser una célula procariota o eucariota que comprende el polinucleótido o el vector descrito y proporcionado en el presente documento o una célula derivada de una célula tal y que contiene la construcción de ácidos nucleicos o el vector. En una realización, la célula huésped comprende, es decir, está genéticamente modificada con el polinucleótido o el vector descrito y proporcionado en el presente documento de tal forma que contenga el polinucleótido integrado en el genoma. Por ejemplo, tales células huésped descritas en el presente documento pueden ser células bacterianas, de levadura u hongo. En un aspecto particular, la célula huésped puede ser capaz de expresar o expresar un polinucleótido de la presente invención. Una visión general de los ejemplos de diferentes sistemas de expresión correspondientes que van a usarse para generar la célula huésped descrita en el presente documento está contenida, por ejemplo, en Methods in Enzymology 153 (1987), 385-516, en Bitter (Methods in Enzymology 153 (1987), 516-544), en Sawers (Applied Microbiology and Biotechnology 46 (1996), 1-9), Billman-Jacobe (Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 500-4), Hockney (Trends in Biotechnology 12 (1994), 456-463) y en Griffiths (Methods in Molecular Biology 75 (1997), 427-440). La transformación o ingeniería genética de la célula huésped con un polinucleótido o vector descrito y proporcionado en el presente documento puede llevarse a cabo mediante procedimientos convencionales como se describen, por ejemplo, en Sambrook y Russell (2001), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, CSH Press, Cold Spring Harbor, NY, USA; Methods in Yeast Genetics, A Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1990.

La presente divulgación se refiere además a composiciones que comprenden péptidos, polinucleótidos, vectores y/o células huésped como se describen y proporcionan en el presente documento. Tales composiciones pueden administrarse a un sujeto en necesidad de intervención médica en una cantidad de aproximadamente 1 ng/kg de peso corporal a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal. Tal sujeto puede ser un mamífero, por ejemplo, un ser humano que está en necesidad de ser tratado o en el que van a prevenirse trastornos asociados a la actividad de GTPasa anómala como se describe en el presente documento. Como se menciona en el contexto de la presente divulgación, ejemplos de enfermedades o trastornos asociados a la actividad de GTPasa anómala son enfermedades asociadas a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares que van a tratarse y/o prevenirse en este contexto son quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria

sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema. La composición descrita y proporcionada en el presente documento puede comprender los péptidos de la presente invención en una cantidad de aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día.

En el contexto de la presente divulgación, la composición que comprende péptidos, polinucleótidos, vectores y/o células huésped como se describen y proporcionan en el presente documento puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente, la presente divulgación también se refiere a una composición farmacéutica que comprende péptidos, polinucleótidos, vectores y/o células huésped como se describen y proporcionan en el presente documento y, opcionalmente, que comprenden además un vehículo, excipiente y/o diluyente farmacéuticamente aceptable. Generalmente, ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados son muy conocidos en la técnica e incluyen soluciones salinas tamponadas con fosfato, agua, emulsiones tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, etc. Las composiciones que comprenden tales vehículos pueden formularse por procedimientos convencionales muy conocidos. Estas composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada, es decir, aproximadamente 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día. La administración de las composiciones (farmacéuticas) puede efectuarse o administrase por diferentes vías, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, por vía intravenosa, subcutánea, transdérmica, intramuscular o intraperitoneal), mediante inhalación (por ejemplo, por vía intrabronquial), como un implante erosionable hecho de polímeros biodegradables (por ejemplo, polilactato o poliglicolato), entérica (por ejemplo, píldora, comprimido (bucal, sublingual, oral, disgregante, cápsula, película fina, disolución líquida o suspensión), polvo, cristales sólidos o líquido), rectal (por ejemplo, supositorio, enema), transdérmica, tópica, vaginal, epicutánea o intranasal. La pauta de dosificación se determinará por el médico adjunto y factores clínicos. Como es muy conocido en las ciencias médicas, las dosificaciones para un paciente cualquiera dependen de muchos factores, que incluyen el tamaño del paciente, área superficial corporal, edad, el compuesto particular que va a administrarse, sexo, momento y vía de administración, salud general, y otros fármacos que se administran simultáneamente. Las composiciones (farmacéuticas) que comprenden péptidos, polinucleótidos, vectores y/o células huésped como se describen y proporcionan en el presente documento pueden administrarse local o sistémicamente. La administración de los péptidos de la presente invención será preferentemente por vía parenteral, por ejemplo, por vía intravenosa o subcutánea. Las composiciones (farmacéuticas) que comprenden péptidos, polinucleótidos, vectores y/o células huésped como se describen y proporcionan en el presente documento también pueden administrarse directamente al sitio diana, por ejemplo, por administración biolística a un sitio diana interno o externo o por catéter a un sitio en una arteria. Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Vehículos acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro sódico, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro sódico, Ringer con lactato o aceites no volátiles. Los vehículos intravenosos incluyen reforzadores fluidos y nutritivos, reforzadores de electrolitos (tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer) y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares. Además, también se prevén dosis por debajo o por encima de los intervalos a modo de ejemplo descritos anteriormente en este documento, especialmente considerando los factores anteriormente mencionados. Los péptidos de la presente divulgación también pueden usarse en combinaciones de dos o más péptidos proporcionados en el presente documento. Por consiguiente, las composiciones de la presente divulgación pueden comprender dos o más péptidos proporcionados en el presente documento, opcionalmente también en combinación con otros compuestos descritos y proporcionados en el presente documento. Además, los péptidos de la presente divulgación pueden usarse en co-terapia conjuntamente con agentes vasoactivos tales como óxido nítrico, prostaciclina, tensioactivos exógenos, anticoagulantes, agentes que eligen como diana la actividad de factor tisular, agentes con el potencial para mejorar la eliminación de líquido alveolar tales como β_2-agonistas, agentes que inhiben las acciones de TNF, terapias anti-IL-8 y anti-CD40L (Curr Med Chem (2008), 15(19): 1911-1924), proteína C activada inhalada (Crit Care (2010), 14(2): R70), inmunosupresores tales como glucocorticosteroides o ciclosporina, antibióticos, disoluciones de HES, coloides usados para la expansión de volumen (Emerg Med J (2003), 20: 306-315) o agentes que eligen como diana desequilibrio patológico del sistema de renina-angiotensina.

El experto sabe que la cantidad eficaz de composiciones farmacéuticas administradas a un individuo dependerá, entre

otras cosas, de la naturaleza del compuesto. Por ejemplo, si dicho compuesto es un péptido como se describe en el presente documento, la cantidad farmacéuticamente eficaz total de composición farmacéutica administrada por vía parenteral por dosis puede estar en el intervalo de aproximadamente 1 µg/kg/día a 100 mg/kg/día de peso corporal del paciente, o 1 µg/kg de peso corporal a aproximadamente 40 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 20 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal por día, o aproximadamente 10 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 15 mg/kg de peso corporal por día, aunque, como se observa anteriormente, esto será objeto de discreción terapéutica. Sin embargo, esta dosis puede disminuirse o aumentarse adicionalmente sujeta a discreción terapéutica, en particular si se aplican concomitantemente ciertos lípidos o si el péptido se somete a ciertas modificaciones químicas. Las cantidades particulares pueden determinarse por pruebas convencionales que son muy conocidas para el experto en la materia.

La composición farmacéutica descrita y proporcionada en el presente documento también puede administrarse adecuadamente por sistemas de liberación sostenida. Ejemplos adecuados de composiciones de liberación sostenida incluyen matrices de polímero semi-permeables en forma de artículos moldeados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Las matrices de liberación sostenida incluyen polilactidas (patente de EE.UU. nº 3.773.919, documento EP-A1 58481), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma-etil-L-glutamato (Biopolymers (1983), 22: 547-556), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) (J Biomed Mater Res (1981), 15: 167-277; Langer, Chem Tech (1982), 12: 98-105), acetato de etilenvinilo (Langer, en el lugar citado) o ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico (documento EP-A1 133988). Las composiciones farmacéuticas de liberación sostenida también pueden incluir compuestos liposómicamente atrapados. Liposomas que contienen la composición farmacéutica pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica, tal como se describen en el documento DE 3218121; Proc Natl Acad Sci USA (1985), 82: 3688-3692; Proc Natl Acad Sci USA 77: 4030-4034 (1980); documentos EP-A1 52322; EP-A1 36676; EP-A1 88046; EP-A1 143949; EP-A1 142641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de EE.UU. nº 4.485.045 y 4.544.545; y documento EP-A1 102324.

En el contexto de la presente divulgación, las formulaciones descritas en el presente documento pueden prepararse poniendo en contacto los componentes de la composición farmacéutica uniforme e íntimamente con vehículos líquidos o vehículos sólidos finamente dividido o ambos. Entonces, si fuera necesario, el producto puede formarse en la formulación deseada. El vehículo puede ser un vehículo parenteral, por ejemplo, una disolución que es isotónica con la sangre del receptor. Ejemplos de tales vehículos de soporte incluyen agua, solución salina, disolución de Ringer y disolución de dextrosa. Vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles y oleato de etilo también pueden ser útiles en el presente documento, además de liposomas como se describe en el presente documento. El vehículo puede contener cantidades adecuadamente menores de aditivos tales como sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química. Tales materiales son preferentemente no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas y pueden incluir tampones tales como fosfato, citrato, succinato, ácido acético y otros ácidos orgánicos o sus sales; antioxidantes tales como ácido ascórbico; (poli)péptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente diez residuos), por ejemplo, poliarginina o tripéptidos; proteínas tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, ácido glutámico, ácido aspártico o arginina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen celulosa o sus derivados, glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol o sorbitol; contraiones tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, poloxámeros o PEG.

En el contexto de la presente divulgación, los componentes de la composición farmacéutica que van a usarse para administración terapéutica son preferentemente estériles. La esterilidad puede llevarse a cabo fácilmente, por ejemplo, por filtración a través de membranas de filtración estériles (por ejemplo, membranas de 0,2 micrómetros). Componentes terapéuticos de la composición farmacéutica pueden disponerse en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Los componentes de la composición farmacéutica generalmente pueden almacenarse en recipientes unitarios o multidosis, por ejemplo, ampollas o viales sellados, como una disolución acuosa o como una formulación liofilizada para reconstitución. Como ejemplo no limitante de una formulación liofilizada, viales de 10 ml pueden envasarse con 5 ml de disolución acuosa al 1 % (peso/volumen) esterilizada por filtración, y lo resultante puede liofilizarse. La disolución de infusión puede prepararse reconstituyendo el (los) compuesto(s) liofilizado(s) usando agua para inyección bacteriostática.

En el contexto de la presente divulgación, los péptidos, polinucleótidos, vectores, células huésped, composiciones y composiciones farmacéuticas descritas y proporcionadas en el presente documento pueden usarse en el tratamiento de o prevención de enfermedades o trastornos asociados a actividad de GTPasa anómala. Ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos asociados a actividad de GTPasa anómala son enfermedades asociadas a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda

(LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Por ejemplo, la presente divulgación se refiere a un péptido que comprende o que consiste en la secuencia GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3) para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno seleccionado del grupo que consiste en enfermedades asociadas a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares que van a tratarse y/o prevenirse por los medios y procedimientos proporcionados en el presente documento comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

La presente divulgación se refiere además a un procedimiento de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno asociado a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. En contexto con la presente divulgación, enfermedades y trastornos particulares que van a tratarse y/o prevenirse mediante el procedimiento proporcionado en el presente documento o por los compuestos proporcionados en el presente documento comprenden particularmente quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema. Tales procedimientos comprenden particularmente la administración de una dosis eficaz de (a) péptido(s), polinucleótido(s), vector(es), célula(s) huésped, composición (composiciones) y/o composición (composiciones) farmacéutica(s) descritas y proporcionadas en el presente documento a un sujeto. En una realización, el sujeto es humano.

Las figuras muestran:

Figura 1: Lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR)

Números de células totales, números de neutrófilos, contenido de proteína e IgM sirvieron de parámetro sustituto para evaluar la disfunción de la barrera (* p>0,05 **p>0,01; *** p>0,001). Las abreviaturas son: LPS: inhalación de LPS; LVt: ventilación con bajo volumen tidal; HVt: ventilación con alto volumen tidal, sc: péptido aleatorio GGGGGSRRIPL (SEC ID Nº: 38); XIB1-b: GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3).

La Figura 1 compara los efectos de la exposición a LPS seguida de LVt o HVt en números de células totales, números de neutrófilos, contenido de proteína total y contenido de IgM dentro de lavados broncoalveolares en animales tratados con sc o XIB1-b. En todos los grupos, XIB1-b reduce todos los parámetros. La significancia se obtuvo como se indica por los asteriscos (*p<0,5, ***p<0,01).

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1: Péptidos

Para los siguientes estudios a modo de ejemplo, los péptidos de la presente invención con la secuencia de aminoácidos GRRPGGASGG (SEC ID Nº: 39; llamada XIB1-a) y GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3; llamada XIB1-b) se usaron como agente activo. Para fines de control se usaron un péptido al azar con la secuencia de aminoácidos GGGGGLSRRIP (SEC ID Nº: 40) o control de disolvente (0,9 % de NaCl). Estos péptidos, además de todos los otros péptidos reivindicados, se sintetizaron por síntesis de FMOC convencional como se describe en la bibliografía (por ejemplo, síntesis de péptidos en fase sólida - “A practical approach” por E. Atherton, R.C. Sheppard, Oxford University press 1989) o por síntesis en fase líquida en la que los péptidos se ensamblan usando una estrategia mixta por química de BOC y condensación de fragmentos como se describe en la bibliografía (E. Wünsch, “Synthese von Peptiden” en “Methoden der organischen Chemie” (Houben-Weyl), 15 Ausg. 4, Teil 1 und 2 Thieme, Stuttgart, 1974).

Ejemplo 2: Inhibición de la actividad de GEF

Para medir el efecto inhibidor de GEF se usaron las siguiente líneas celulares: Caco-2 (células epiteliales de adenocarcinoma), ECV 304 (células epiteliales de carcinoma de vejiga) y HpMec (células endoteliales, células microvasculares pulmonares inmortalizadas). Todas las células se cultivaron a condiciones estándar (37 ºC, 5 % de CO_2 y 95 % de humedad relativa (HR)). Medio de cultivo usado para Caco-2: DMEM + piruvato de sodio 1 mM + 20 % de SBF + 1 % de penicilina-estreptomicina; para ECV 304: RPMI 1640 + 10 % de SBF + 1 % de penicilina-estreptomicina; y para HpMec: IMDM + Hepes 25 mM + 10 % de suero humano + 1 % de penicilina-estreptomicina + 1 % de L-glutamina + ECGS/heparina 2 ml. 4 h antes del experimento, las células se dejaron morir por retirada del suero. Para inducir actividad de GEF, las células se estimularon con trombina, lipopolisacárido (LPS) o PMA durante el tiempo indicado en presencia o ausencia de 50 µg/ml de XIB1-a o XIB1-b. Después de la estimulación, las fracciones de membrana se prepararon usando el kit “Compartmental Protein Extraction” comercialmente disponible de Biochain Institutes. Las fracciones de membrana se prepararon según las instrucciones del fabricante. La actividad de GEF en lisados de membrana se determinó usando el kit “RhoGEF Exchange Assay Biochem” de Cytoskeleton Inc. según instrucciones del fabricante. La

actividad de GEF se midió como fluorescencia usando Fluoroskan Ascent FL 2.6 de Thermo Electron Corporation. La longitud de onda del filtro de excitación se fijó a 355 nm y la longitud de onda del filtro de emisión a 460 nm.

Tabla 1

Valores relativos en comparación con control sin estimular; (*) p < 0,05 en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b

Células ECV 304	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	1	0,5
Péptido de control 5 min	1	0,5
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,4
XIB1-a o XIB1-b 5 min	1	0,3
Trombina 1 U/ml 1 min	5	1,1
Trombina 1 U/ml 5 min	3,4	0,9
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	2,5*	1
Trombina 1 U/ml + XIB1a o XIB1-b; 5 min	1,5*	0,2
LPS 100 µg/ml, 1 min	3,2	1,1
LPS 100 µg/ml, 5 min	3,2	1,1
LPS 100 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b, 1 min	1,7*	0,9
LPS 100 µg/ml + XIB1a o XIB1-b, 5 min	1,3*	0,8
CaCo-2	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	1	0,2
Péptido de control 5 min	1	0,3
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,5
XIB1-a o XIB1.b 5 min	1	0,5
PMA 1 µg/ml 1 min	2,5	0,5
PMA 1 µg/ml 5 min	1,8	0,8
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	1,4*	0,2
PMA 1 µg/ml + XIB1a o XIB1-b; 5 min	1,5	0,3

(continuación)

HpMec	Media	DE
Péptido de control 1 min	1	0,2
Péptido de control 5 min	1	0,2
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,3
XIB1-a o XIB1-b 5 min	1	0,5
Trombina 1 U/ml 1 min	3,5	1,1
Trombina 1 U/ml 5 min	3	0,6
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	1,8*	0,4
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 5 min	2,1*	0,6

Como puede sacarse de la Tabla 1, en células ECV 304, la estimulación de trombina y LPS produjo un aumento de la actividad de GEF en comparación con células de control sin tratar. Las células ECV 304 estimuladas con trombina o LPS en presencia de XIB1-a o XIB1-b muestran una reducción significativa de la actividad de GEF en comparación con el tratamiento con trombina o LPS solo.

En células CaCo-2, un estímulo con PMA de 1 min produjo un aumento de 2,5 veces en la actividad de GEF. La magnitud de la activación de GEF se redujo significativamente cuando las células CaCo-2 se co-trataron con PMA y XIB1-a o XIB1-b.

En células HepMec, la trombina indujo un aumento de 3,5 veces en la actividad de GEF después de 1 min y un aumento de 3 veces después de 5 min de estimulación. El co-tratamiento de células con XIB1-b redujo significativamente la magnitud de la actividad de GEF después de 1 min y después de 5 min. El tratamiento con XIB1-a o XIB 1-b solo no alteró la actividad de GEF básica.

Los resultados demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a y XIB1-b reducen la actividad de GEF inducida por diferentes agentes estimulantes en células epiteliales y endoteliales, pero no alteran la actividad de GEF básica en células sin estimular. Esto muestra que los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento o prevención de enfermedades o trastornos asociados a actividad de GTPasa anómala. En este contexto, trastornos y enfermedades particulares pueden ser enfermedades y trastornos que pueden ser quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Ejemplo 3: Reducción de RhoA asociada a GTP

Para medir RhoA activa asociada a GTP se usaron las siguiente líneas celulares: Caco-2, ECV 304 y HpMec. Todas las células se cultivaron a condiciones estándar (37 ºC, 5 % de CO_2 y 95 % de HR). 4 h antes del experimento, las células se dejaron morir por retirada de suero. Para inducir actividad de GEF, las células se estimularon con trombina, LPS o PMA durante el tiempo indicado en presencia o ausencia de 50 µg/ml de XIB1-a o XIB1-b. Después de la estimulación, las fracciones de membrana se prepararon usando el kit “Compartmental Protein Extraction” comercialmente disponible de Biochain Institutes. Las fracciones de membrana se prepararon según las instrucciones del fabricante. La fracción de membrana se separó sobre 15 % de gel de poliacrilamida según procedimientos convencionales de electroforesis en gel. Los geles se transfirieron después sobre una membrana de nitrocelulosa según procedimientos convencionales de transferencia Western. RhoA unida a GTP se detectó usando anticuerpo monoclonal para RhoA-GTP de NewEast Inc. en una dilución de 1:5000. Las bandas de proteína se analizaron con el sistema de análisis Dolphin-1D (Wealtec).

Tabla 2

Valores relativos en comparación con control sin estimular; (*) p < 0,05 en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b

Células ECV 304	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	1	0,1
Péptido de control 5 min	1	0,3
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,5
XIB1-a o XIB1-b 5 min	1	0,4
Trombina 1 U/ml 1 min	4,3	1,1
Trombina 1 U/ml 5 min	3,2	1,3
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	2,1*	0,5
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 5 min	1,9*	0,4
LPS 100 µg/ml; 1 min	2,7	1,1
LPS 100 µg/ml; 5 min	2,9	1,1
LPS 100 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b, 1 min	1, 6*	1,6
LPS 100 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b 5 min	1,7*	1
CaCo-2	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	1	0,3
Péptido de control 5 min	1	0,2
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,4
XIB1-a o XIB1-b 5 min	1	0,2
PMA 1 µg/ml 1 min	2,3	1,2
PMA 1 µg/ml 5 min	2,0	0,6
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b 1 min	1,4*	0,5
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b 5 min	1,3*	0,1
HpMec	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	1	0,3
Péptido de control 5 min	1	0,2
XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,4
XIB1-a o XIB1-b 5 min	1	0,2
Trombina 1 U/ml 1 min	3,8	1,1
Trombina 1 U/ml 5 min	3,2	1,2
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b 1 min	2,1*	0,3
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b 5 min	1,3*	0,4

Como puede sacarse de la Tabla 2, en células ECV 304, la estimulación de trombina y LPS produjo un aumento de la actividad de RhoA en comparación con células de control sin tratar. Las células ECV 304 estimuladas con trombina o LPS en presencia de XIB1-a o XIB1-b muestran una reducción significativa en la actividad de RhoA en comparación con

el tratamiento con trombina o LPS solo.

En células CaCo-2, el estímulo con PMA produjo un aumento de 2,3 veces de la actividad de RhoA después de 1 min de estimulación y un aumento de 2 veces de la actividad de RhoA después de 5 min de estimulación. La magnitud de la activación de RhoA después de 1 y después de 5 min se redujo significativamente cuando las células CaCo-2 se co-trataron con PMA y XIB1-a o XIB1-b.

En células HepMec, la trombina indujo un aumento de 3,8 veces en la actividad de RhoA después de 1 min y un aumento de 3,2 veces después de 5 min de estimulación. El co-tratamiento de células con XIB1-b redujo significativamente la magnitud de la actividad de RhoA después de 1 min y después de 5 min. El tratamiento con XIB1-a o XIB1-b solo no alteró la actividad de RhoA básica.

Estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a o XIB1-b reducen la actividad de RhoA inducida por diferentes agentes estimulantes en células epiteliales y endoteliales, pero no alteran la actividad de GEF básica en células sin estimular. La actividad de RhoA está controlada por la activación de GEF como se ha descrito anteriormente. Los resultados demuestran que XIB1-a y/o XIB1-b están disminuyendo la actividad de RhoA inhibiendo la actividad de GEF y así son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Particularmente, los péptidos proporcionados en el presente documento son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos tales como quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Ejemplo 4: Cadena ligera de miosina (MLC) fosforilada y formación de fibras de tensión de actina

Para medir la fosforilación de MLC y la formación de fibras de tensión de actina se usaron las siguientes líneas celulares: Caco-2, ECV 304 y HpMec. Todas las células se cultivaron a condiciones estándar (37 ºC, 5 % de CO_2 y 95 de % HR). Medio de cultivo usado: para Caco-2: DMEM + piruvato de sodio 1 mM + 20 % de SBF + 1 % de penicilina-estreptomicina; para ECV 304: RPMI 1640 + 10 % de SBF + 1 % de penicilina-estreptomicina; y para HpMec: IMDM + Hepes 25 mM + 10 % de suero humano + 1 % de penicilina-estreptomicina + 1 % de L-glutamina + ECGS/heparina 2 ml. 4 h antes del experimento, las células se dejaron morir por retirada de suero. Para inducir actividad de GEF, las células se estimularon con trombina, LPS o PMA durante el tiempo indicado en presencia o ausencia de 50 µg/ml de XIB1-a o XIB1-b. Después de la estimulación, las células se fijaron usando 4 % de PFA. Se detectó fosfo-MLC usando el "anticuerpo de conejo anti-cadena ligera de miosina fosforilada" de Chemicon en una concentración de 3 µl/ml en PBS (Gibco) complementado con 0,1 % de Triton X-100. Como anticuerpo de detección, "anticuerpo anti-IgG de conejo" marcado con Alexa 448 de Invitrogen se usó a una concentración de 0,5 µl/ml en PBS (Gibco) complementado con 0,1 % de Triton X-100. La actina se detectó usando faloidina marcada con TRITC en una concentración de 0,5 µl/ml en PBS (Gibco) complementado con 0,1 % de Triton. Las células teñidas se analizaron usando un microscopio de barrido láser de Zeiss. La evaluación de la activación cito-esquelética se realizó por 2 observadores independientes que se cegaron a las condiciones. Los criterios de evaluación se fijaron del siguiente modo:

Actina: haces de actina paralelos ausentes = 0; formación de haces distintos = 1; haces paralelos prominentes = 2; fosfo-MLC: presente en polos celulares = 0; ligera co-localización con haces de actina = 1; co-localización importante con haces de actina = 2

Tabla 3

Valores relativos en comparación con control sin estimular; (*) $p < 0,05$ en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b; (*) $p < 0,05$ en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b

Células ECV 304	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	0	0
Péptido de control 5 min	0	0
Péptido XIB1-a o XIB1-b 1 min	1	0,2
Péptido XIB1-a o XIB1-b 5 min	0	0
Trombina 1 U/ml 1 min	4	1,1

(continuación)

Células ECV 304	**Media**	**DE**
Trombina 1 U/ml 5 min	4	1,4
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	1*	0,3
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 5 min	1*	1,1
LPS 100 µg/ml 1 min	3	1,2
LPS 100 µg/ml 5 min	3	1,3
LPS 100 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b, 1 min	1*	1,1
LPS 100 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b, 5 min	1*	1,2
CaCo-2	**Media**	**DE**
Péptido de control 1 min	0	0
Péptido de control 5 min	0	0
XIB1-a o XIB1-b 1 min	0	0
XIB1-a o XIB1-b 5 min	0	0
PMA 1 µg/ml 1 min	3	0,3
PMA 1 µg/ml 5 min	3	1,2
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	1*	1,1
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b; 5 min	2*	1,3
HpMec	**Media**	**DE**
Péptido de control; 1 min	0	0
Péptido de control ; 5 min	0	0
XIB1-a o XIB1-b 1 min	0	0
XIB1-a o XIB1-b 5 min	0	0
Trombina 1 U/ml 1 min	4	2
Trombina 1 U/ml 5 min	4	1,8
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 1 min	1*	0,5
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b; 5 min	0,3*	0,3

Como puede sacarse de la Tabla 3, en células ECV 304, la estimulación de trombina y LPS indujo fosforilación de MLC y formación de fibras de tensión de actina. Las células ECV 304 estimuladas con trombina o LPS en presencia de XIB1-a o XIB1-b muestran una reducción significativa en la fosforilación de MLC y formación de fibras de estrés de actina en comparación con el tratamiento con trombina o LPS solo.

En células CaCo-2, un estímulo con PMA indujo un aumento en la fosforilación de MLC y formación de fibras de estrés de actina después de 1 min y después de 5 min de estimulación. La magnitud de la activación citoesquelética después de 1 y después de 5 min se redujo significativamente cuando las células CaCo-2 se co-trataron con PMA y XIB1-a o XIB1-b.

En células HepMec, la trombina indujo un aumento en la fosforilación de MLC y formación de fibras de estrés de actina

después de 1 min y después de 5 min de estimulación. El co-tratamiento de células con XIB1-a o XIB1-b redujo significativamente la magnitud de la activación citoesquelética después de 1 min y después de 5 min. El tratamiento con XIB1-a o XIB1-b solo no alteró la actividad citoesquelética básica.

Los resultados demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a o XIB1-b reducen la fosforilación de MLC y formación de fibras de estrés de actina inducida por diferentes agentes estimulantes en células epiteliales y endoteliales. La fosforilación de MLC y la formación de fibras de estrés de actina están controladas por la actividad de RhoA como se ha descrito anteriormente. Los resultados demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a y/o XIB1-b están disminuyendo la fosforilación de MLC y la fibra de tensión de actina inhibiendo la actividad de GEF y posterior la actividad de RhoA y así son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Ejemplo 5: Permeabilidad endotelial y epitelial

Para medir la permeabilidad a través de las barreras endoteliales y epiteliales se usaron las siguientes líneas celulares: Caco-2, ECV 304 y HpMec. Todas las células se cultivaron a confluencia a condiciones estándar sobre un sistema Transwell (Costar) con un tamaño de poro de 4 µm. Al inicio del experimento, los medios de crecimiento se retiraron y se sustituyeron con disolución salina tamponada con Hank. La cámara superior se complementó con 2 mg/ml de dextrano marcado con FITC (Sigma Aldrich). Las células se estimularon como se indica en la Tabla 4. Muestras de 30 min de las cámaras inferiores se recogieron y se determinaron para fluorescencia (Fluoroskan Ascent FL, Thermo Electron). 50 µg/ml de XIB1-a y XIB1-b se añadieron cuando se indicó.

Tabla 4

Valores relativos en comparación con control sin estimular; (*) $p < 0,05$ en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b; (*) $p < 0,05$ en comparación con pruebas sin XIB1-a o XIB1-b

Células ECV 304	**Media**	**DE**
Péptido de control	1	0,1
XIB-1b	1	0,3
Trombina 1 U/ml	3	1,3
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b	1,5*	1
LPS 100 µg/ml	2,3	1
LPS 100 µg/ml + XIB1	1,1*	0,6
CaCo-2	**Media**	**DE**
Péptido de control	1	0,3
XIB1-a o XIB1-b	1	0,3
PMA 1 µg/ml 1 min	2,5	1
PMA 1 µg/ml + XIB1-a o XIB1-b	1,4*	0,6
HpMec	**Media**	**DE**
Péptido de control	1	0
XIB1-a o XIB1-b	1	0,5

(continuación)

HpMec	Media	DE
Trombina 1 U/ml	3,4	1,1
Trombina 1 U/ml + XIB1-a o XIB1-b	1,8*	1,3

Como puede sacarse de la Tabla 4, en células ECV 304, la estimulación de trombina y LPS aumenta la permeabilidad de la barrera. Las células ECV 304 estimuladas con trombina o LPS en presencia de XIB1-a o XIB1-b muestran una reducción significativa en la permeabilidad de la barrera en comparación con el tratamiento con trombina o LPS solo.

En células CaCo-2, la estimulación con PMA indujo un aumento en la permeabilidad de la barrera. La función de la barrera mejoró significativamente cuando las células CaCo-2 se co-trataron con PMA y XIB1-a o XIB1-b.

En células HepMec, la trombina indujo un aumento en la permeabilidad de la barrera. El tratamiento de las células con XIB1-a o XIB1-b redujo significativamente la permeabilidad de la barrera inducida por trombina. El tratamiento con XIB1-a o XIB1-b o péptido de control solo no alteró la función de la barrera.

Estos resultados demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a o XIB1-b reducen la permeabilidad de la barrera inducida por diferentes agentes estimulantes en células epiteliales y endoteliales. La permeabilidad de la barrera y la función de la barrera están controladas por fibras de actina y miosina. La activación de este componente citoesquelético produce la contracción celular y el redondeo celular. Las células vecinas pierden contacto aumentando así la permeabilidad del tejido. Por consiguiente, los experimentos demuestran que los péptidos de la presente invención tales como XIB1-a y/o XIB1-b están disminuyendo la permeabilidad de la barrera inducida por diferentes agentes en células epiteliales y endoteliales y así son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Ejemplo 6: Lesión pulmonar inducida por LPS

Ratones C57Bl/6 macho (Charles River, Alemania) se mantuvieron en el animalario de la Facultad de Medicina de Viena, se alimentaron con dieta convencional y se proporcionó agua a voluntad. Todas las intervenciones se realizaron según las pautas de la AAALAC (*Asociación Internacional para la Evaluación y Acreditación del Cuidado de Animales de Laboratorio*). Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético de la Facultad de Medicina de Viena. Los ratones se anestesiaron con isoflurano y se trataron con 100 ng de LPS *(E. coli* O55:B5, Sigma Aldrich) por vía intranasal. XIB1-a o XIB1-b se aplicó tanto por vía intraperitoneal (2 x 2 mg/kg) como mediante inhalación (2 x 4 mg/kg), la primera administración se realizó concomitantemente con la administración de LPS, la segunda administración se realizó 1 h después de la inhalación de LPS.

Lavado broncoalveolar

Después de 6 h, los ratones se anestesiaron con ketamina (Pfizer, Viena, Austria) y se sacrificaron por sangrado de la vena cava inferior. La tráquea se expuso mediante una incisión en la línea media y se canuló con un catéter estéril de 20 de calibre (BD Venflon™, Becton Dickinson Infusion Therapy, Helsingborg, Suecia). El líquido de lavado broncoalveolar bilateral (BALF) se obtuvo instilando dos alícuotas de 0,5 ml de solución salina estéril. Se recuperaron aproximadamente 0,9-1 ml de BALF por ratón. Los números totales de células se contaron de cada muestra usando un hemocitómetro (cámara de Türck), los recuentos de células diferenciales de BALF se hicieron en preparaciones de Cytospin teñidas con Giemsa. Para las mediciones de proteína, BALF se diluyó 1:2 en tampón que contenía NaCl 300 mM, Tris 30 mM, $MgCl_2$ 2 mM, $CaCl_2$ 2 mM y pepstatina A, leupeptina y aprotinina (todas 20 ng/ml; pH 7,4). Los niveles de proteína en BALF se midieron usando el kit de proteínas BCA según las instrucciones del fabricante (Pierce, Rockford, IL).

Tabla 5

Los números de neutrófilos y el contenido de albúmina de los lavados broncoalveolares sirven de parámetro sustituto para la disfunción de la barrera

n=20 por grupo experimental, administración intraperitoneal de XIB1-b

Los valores representan números de neutrófilos/ml (x 10^3) en el BALF (media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y los controles es significativa ($p<0,05$)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b
85+/-29	88+/-33	25+/-22

n=20 por grupo experimental, administración intraperitoneal de XIB1-a o XIB1-b

Los valores representan el contenido de albúmina de BALF (µg/ml; media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y los controles es significativa ($p<0,05$)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b
220+/-15	212+/-10	120+/-12

n=20 por grupo experimental, administración intratraqueal de XIB1-b

Los valores representan números de neutrófilos/ml (x 10^3) en el BALF (media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y los controles es significativa ($p<0,05$)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS más XIB1-b
80+/-28	90+/-30	28+/-23

n=20 por grupo experimental, administración intratraqueal de XIB1-a o XIB1-b

Los valores representan el contenido de albúmina de BALF (µg/ml; media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y los controles es significativa ($p<0,05$)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS más XIB1-b
244+/-28	237+/-32	98+/-20

Como puede sacarse de la Tabla 5, el tratamiento intranasal de ratones con LPS indujo la disfunción de barreras en el pulmón transmitido por la elevada entrada de neutrófilos y acumulación de albúmina en el espacio broncoalveolar. El tratamiento de ratones con XIB1-b mejora significativamente la función de la barrera, los ratones mostraron menos neutrófilos y disminución de albúmina en el BALF. El efecto beneficioso de XIB1-a o XIB1-b fue igual en grupos de animales tratados por vía intraperitoneal e intratraqueal.

El tratamiento de ratones con péptido de control no alteró los números de neutrófilos y el contenido de albúmina del BALF.

El modelo de inhalación de LPS es un modelo animal aceptado para imitar LPA/SDRA ya que se parece a la enfermedad humana con respecto a los cambios de permeabilidad en células endoteliales y epiteliales y posterior acumulación de neutrófilos y albúmina en el espacio broncoalveolar (Lung Cell Mol Physiol (2008), 295: L379-L399). El efecto beneficioso de XIB1-a o XIB1-b en el modelo de inhalación de LPS demuestra la utilidad de los péptidos de la presente invención para tratar y/o prevenir enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Específicamente, los péptidos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o prevención de enfermedades y trastornos tales como, por ejemplo, lesión pulmonar aguda (LPA) o síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA).

Comparación XIB1-b con Bβ15-42

Además, la misma configuración que se ha descrito anteriormente se usó para comparar el impacto de XIB1-b en comparación con Bβ15-42 (PLoS ONE (2009), 4(4): e5391), un péptido derivado de fibrina que tiene la secuencia GHRPLDKKKREEAPSLRPAPPPISGGGYR (SEC ID Nº: 41). Bβ15-42 se añadió del mismo modo que XIB1-b. De nuevo se midió el contenido de proteína y el número de células de BALF.

Tabla 6

n=20 por grupo experimental, administración intraperitoneal de XIB1-b o Bβ15-42

Los valores representan números de neutrófilos/ml (x 10^3) en el BALF (media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y los controles es significativa (p<0,05)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b	LPS + Bβ15-42
89+/-29	91+/-33	27+/-26	33+/-22

n=20 por grupo experimental, administración intraperitoneal de XIB1-b o Bβ15-42

Los valores representan el contenido de albúmina de BALF (µg/ml; media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y controles además de entre XIB1-b y Bβ15-42 es significativa (p<0,05)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b	LPS + Bβ15-42
255+/-25	275-30	110+/-15	160+/-20

n=20 por grupo experimental, administración intratraqueal más intraperitoneal de XIB1-b o Bβ15-42

Los valores representan números de neutrófilos/ml (x 10^3) en el BALF (media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y controles, además de entre XIB1-b y Bβ15-42, es significativa (p<0,05)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b	LPS + Bβ15-42
88+/-24	94+/-30	15+/-15	35+/-10

n=20 por grupo experimental, administración intraperitoneal de XIB1-b o Bβ15-42

Los valores representan el contenido de albúmina de BALF (µg/ml; media +/ DE) 6 h después de la administración de LPS. La diferencia entre XIB1-b y controles, además de entre XIB1-b y Bβ15-42, es significativa (p<0,05)

LPS + NaCl	LPS + péptido de control	LPS + XIB1-b	LPS + Bβ15-42
279+/-34	250+/-25	80-12	152+/-35

Usando el modelo de inhalación de LPS, los efectos de XIB1-b y Bβ15-42 sobre la entrada de neutrófilos y la acumulación de albúmina en el BALF se compararon. El tratamiento intraperitoneal de ratones con XIB1-b o Bβ15-42 redujo la infiltración de neutrófilos en el BALF en un intervalo comparable. Aún, como se encontró sorprendentemente en el presente documento, XIB1-b fue significativamente más eficaz en reducir el contenido de albúmina del BALF que Bβ15-42. Esto muestra claramente que XIB1-b es más eficaz en el tratamiento y la prevención enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial como se describe en el presente documento. Enfermedades y trastornos particulares comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

Ejemplo 7: Lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR)

Los experimentos se realizaron con C57BL/6 sanos (edad 8 - 10 semanas, con pesos que oscilan de 19 - 25 g). Todas las intervenciones se realizaron según las pautas de AAALAC. Todos los experimentos fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Ámsterdam.

Pre-exposición a LPS.

Se expusieron ratones a LPS (dosificación: 50 µg por ratón) (o solución salina), mediante inyección intranasal 2 h antes del inicio de la ventilación mecánica, para inducir lesión pulmonar.

Administración de XIB1-b o péptido aleatorio.

XIB1-1b (o péptido aleatorio) se administró i.v. 10 min antes del inicio de la ventilación mecánica (dosificación: 4 mg/kg de dosis de carga, seguido de administración de inyecciones i.v. 1 mg/kg/h.

Instrumentación y anestesia durante la ventilación mecánica.

Durante todos los experimentos, la temperatura rectal se mantuvo entre 36,5 - 37,5 ºC usando una trayectoria de calentamiento. La anestesia se logró con inyección intraperitoneal de una mezcla de ketamina, medetomidina y atropina.

Estrategias de ventilación mecánica.

Un conector de tubo en Y con diámetro externo de 1,0 mm y diámetro interno de 0,6 mm se insertó quirúrgicamente en la tráquea bajo anestesia general. Los ratones se colocaron en una posición supina y se conectaron a un respirador. Los ratones se ventilaron con presión controlada con tanto una presión inspiratoria de 10 cm de H_2O (produciendo $V_T \sim 7,5$ ml/kg; V_T, LV_T bajo) como una presión inspiratoria de 18 cm de H_2O (produciendo $V_T \sim 15$ ml/kg; V_T, HV_T alta). La presión positiva espiratoria final (PEEP) se fija a 2 cm de H_2O con ambas estrategias de MV. La fracción de oxígeno inspirado se mantuvo a 0,5 durante todo el experimento. La relación de inspiración con respecto a espiración se mantuvo a 1:1 durante todo el experimento.

Estrategias de soporte de fluido

Los ratones recibieron bolos intraperitoneales de solución salina normal 1 hora antes del inicio de MV, seguido de bolos de solución salina normal mediante un catéter intraperitoneal cada 30 min.

Hemodinámica y monitorización ventilatoria

La tensión arterial sistólica y la frecuencia cardíaca se monitorizaron no invasivamente durante todo el experimento completo. V_T se comprobó cada hora con un sistema neumotacográfico.

Mediciones

Se obtuvo BALF instilando 3 veces alícuotas de 0,5 ml de solución salina por un catéter Abbocath-T de 22 de calibre (Abbott, Sligo, Irlanda) en la tráquea. Se recuperó aproximadamente 1,0 ml de BALF por ratón y los números de células se determinaron usando un hemacitómetro (Beckman Coulter, Fullerton, CA). Posteriormente se hicieron recuentos diferenciales en preparaciones de Cytospin teñidas con una tinción de Giemsa modificada, Dif-Quick (Dade Behring AG, Düdingen, Suiza). El sobrenadante se almacenó a -80 ºC.

Ensayos

Los niveles de proteína total en BALF se determinan usando un kit de ensayo de proteínas de Bradford (OZ Biosciences, Marsella, Francia) según instrucciones del fabricante con albúmina de suero bovino como patrón. Se determinó IgM de ratón por ELISA usando placas de micropocillos de 96 tiras sensibilizadas con IgM anti-ratón según instrucciones del fabricante (kit IMMUNO-TEK de ZeptoMetrix).

Como resultado se mostró que XIB1-b reduce la inflamación del pulmón que se correlaciona con menos lesión pulmonar y reduce el edema pulmonar; véase la Figura 1.

En este experimento, la lesión pulmonar se indujo por una pre-exposición de ratones a LPS seguido de ventilación mecánica con volumen tidal alto o bajo. Los ratones tanto se trataron con XIB1-b como péptido aleatorizado. El tratamiento de ratones con XIB1-b produjo una disminución significativa del número de células total, número de neutrófilos, contenido de proteína total y contenido de IgM en el BALF en el protocolo experimental más agresivo (LPS-HTV). No se observó mejora usando péptido aleatorizado. Usando el protocolo experimental modesto, XIB1-b (LPS+LTV) redujo significativamente los números de células totales y números de neutrófilos en el BALF en comparación con péptido aleatorizado. El modesto protocolo de tratamiento no produjo un aumento pronunciado en el contenido de proteína total y contenido de IgM, así no pudo observarse efecto de XIB1-b.

El presente modelo animal se parece a la situación clínica de pacientes que desarrollan LPA/SDRA como una secuela de neumonía. Los resultados positivos obtenidos con XIB1-b demuestran la idoneidad de los péptidos de la presente invención para tratar o prevenir enfermedades o trastornos asociados a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial. Enfermedades y trastornos particulares comprenden quemaduras, lesión pulmonar aguda (LPA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), lesión renal aguda (LRA), septicemia, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) o edema.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> XiberScience GmbH

<120> Péptidos como agentes activos para estabilizar barreras biológicas

<130> T1323 PCT S3

<160> 41

<170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: inserción variable"

<220>

<221> misc_features

<222> (2) .. (2)

<223> Xaa es R o A

<220>

<221> misc_features

<222> (5) .. (5)

<223> Xaa tanto se omite como es L o V

<220>

<221> misc_features

<222> (6)..(6)

<223> Xaa tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos

<220>

<221> misc_features

<222> (7)..(7)

<223> Xaa tanto se omite como es GG

<220>

<221> misc_features

<222> (8) .. (8)

<223> Xaa es dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, I y S

<220>

<221> misc_features

<222> (11) .. (11)

<223> Xaa tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos

<400> 1

```
Gly Xaa Arg Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Xaa
1               5                   10
```

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa tanto se omite como es GG

<400> 2

```
Gly Arg Arg Pro Leu Xaa Ile Ser Gly Gly
1               5                   10
```

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina: XIB1-b"

<400> 3

```
Gly Arg Arg Pro Leu Gly Gly Ile Ser Gly Gly
1               5                   10
```

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 4

```
Gly Arg Arg Pro Leu Ile Ser Gly Gly
1               5
```

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<220>

<221> misc_feature

<222> (6) .. (6)

<223> Xaa tanto se omite como es GG

<400> 5

Gly Arg Arg Pro Val Xaa Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 6

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 6

Gly Arg Arg Pro Val Gly Gly Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 7

Gly Arg Arg Pro Val Ile Ser Gly Gly
1 5

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 8

Gly Arg Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 9

Gly Arg Arg Pro Val Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 10

Gly Arg Arg Pro Leu Gly Gly Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 11

Gly Arg Arg Pro Val Gly Gly Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 12

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 12

Gly Arg Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 13

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 13

Gly Arg Arg Pro Val Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 14

Gly Arg Arg Pro Leu Gly Gly Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 15

Gly Arg Arg Pro Val Gly Gly Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 16

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 16

Gly Arg Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 17

Gly Arg Arg Pro Val Pro Pro Pro Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 18

Gly Arg Arg Pro Leu Gly Gly Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 19

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 19

Gly Arg Arg Pro Val Gly Gly Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 20

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 20

Gly Arg Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 21

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 21

Gly Arg Arg Pro Val Pro Pro Pro Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 22

Gly Ala Arg Pro Leu Gly Gly Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 23

Gly Ala Arg Pro Val Gly Gly Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 24

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 24

Gly Ala Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 25

Gly Ala Arg Pro Val Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 26

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 26

Gly Ala Arg Pro Leu Gly Gly Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 27

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 27

Gly Ala Arg Pro Val Gly Gly Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 28

Gly Ala Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 29

Gly Ala Arg Pro Val Pro Pro Pro Ala Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 30

Gly Ala Arg Pro Leu Gly Gly Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 31

Gly Ala Arg Pro Val Gly Gly Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 32

Gly Ala Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 33

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 33

Gly Ala Arg Pro Val Pro Pro Pro Ala Ser Gly Gly
1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 34

Gly Ala Arg Pro Leu Gly Gly Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 35

Gly Ala Arg Pro Val Gly Gly Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 36

Gly Ala Arg Pro Leu Pro Pro Pro Ile Ala Gly Gly
1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina"

<400> 37

```
Gly Ala Arg Pro Val Pro Pro Pro Ile Ala Gly Gly
1               5                   10
```

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: inserción variable"

<400> 38

```
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Arg Arg Ile Pro Leu
1               5                   10
```

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido derivado de cingulina: XIB1-a"

<400> 39

```
Gly Arg Arg Pro Gly Gly Ala Ser Gly Gly
1               5                   10
```

<210> 40

<211> 11

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: inserción variable"

<400> 40

```
Gly Gly Gly Gly Gly Leu Ser Arg Arg Ile Pro
1               5                   10
```

<210> 41

<211> 29

<212> PRT

<213> secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de secuencia artificial: péptido Bbeta 15-42"

<400> 41

```
Gly His Arg Pro Leu Asp Lys Lys Lys Arg Glu Glu Ala Pro Ser Leu
1               5                   10                  15

Arg Pro Ala Pro Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Tyr Arg
            20                  25
```

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos

$GX_1RPX_2X_3X_4\ X_5GGX_6$ (SEC ID Nº: 1)

en la que

X_1 es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en R y A;

X_2 tanto se omite como es un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en L y V;

X_3 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos;

X_4 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en GG;

X_5 representa dos aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en A, I y S; y

X_6 tanto se omite como es una secuencia de aminoácidos que consiste en 1 a 5 aminoácidos.

2. El péptido de la reivindicación 1 que puede inhibir la actividad de una Rho GTPasa.

3. El péptido de la reivindicación 1 o 2, en el que X_1 es R.

4. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que X_2 es L o V.

5. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que X_3 es PPP.

6. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que X_4 es GG.

7. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que X_5 es IS o AS.

8. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que X_6 se omite.

9. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que X_1 es R, X_2 es L, X_3 se omite, X_5 es IS y X_6 se omite, o en el que X_1 es R, X_2 es V, X_3 se omite, X_5 es IS y X_6 se omite.

10. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho péptido consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en

GRRPLGGISGG (SEC ID Nº: 3);

GRRPVGGISGG (SEC ID Nº: 6);

GRRPLISGG (SEC ID Nº: 4);

GRRPVISGG (SEC ID Nº: 7);

GRRPLPPPISGG (SEC ID Nº: 8);

GRRPVPPPISGG (SEC ID Nº: 9);

GRRPLGGAAGG (SEC ID Nº: 10);

GRRPVGGAAGG (SEC ID Nº: 11);

GRRPLPPPAAGG (SEC ID Nº: 12);

GRRPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 13);

GRRPLGGASGG (SEC ID Nº: 14);

GRRPVGGASGG (SEC ID Nº: 15);

GRRPLPPPASGG (SEC ID Nº: 16);

GRRPVPPPASGG (SEC ID Nº: 17);

GRRPLGGIAGG (SEC ID Nº: 18);

GRRPVGGIAGG (SEC ID Nº: 19);

GRRPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 20);

GRRPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 21);

GARPLGGISGG (SEC ID Nº: 22);

GARPVGGISGG (SEC ID Nº: 23);

GARPLPPPISGG (SEC ID Nº: 24);

GARPVPPPISGG (SEC ID Nº: 25);

GARPLGGAAGG (SEC ID Nº: 26);

GARPVGGAAGG (SEC ID Nº: 27);

GARPLPPPAAGG (SEC ID Nº: 28);

GARPVPPPAAGG (SEC ID Nº: 29);

GARPLGGASGG (SEC ID Nº: 30);

GARPVGGASGG (SEC ID Nº: 31);

GARPLPPPASGG (SEC ID Nº: 32);

GARPVPPPASGG (SEC ID Nº: 33);

GARPLGGIAGG (SEC ID Nº: 34);

GARPVGGIAGG (SEC ID Nº: 35);

GARPLPPPIAGG (SEC ID Nº: 36); y

GARPVPPPIAGG (SEC ID Nº: 37).

11. Un polinucleótido que codifica el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

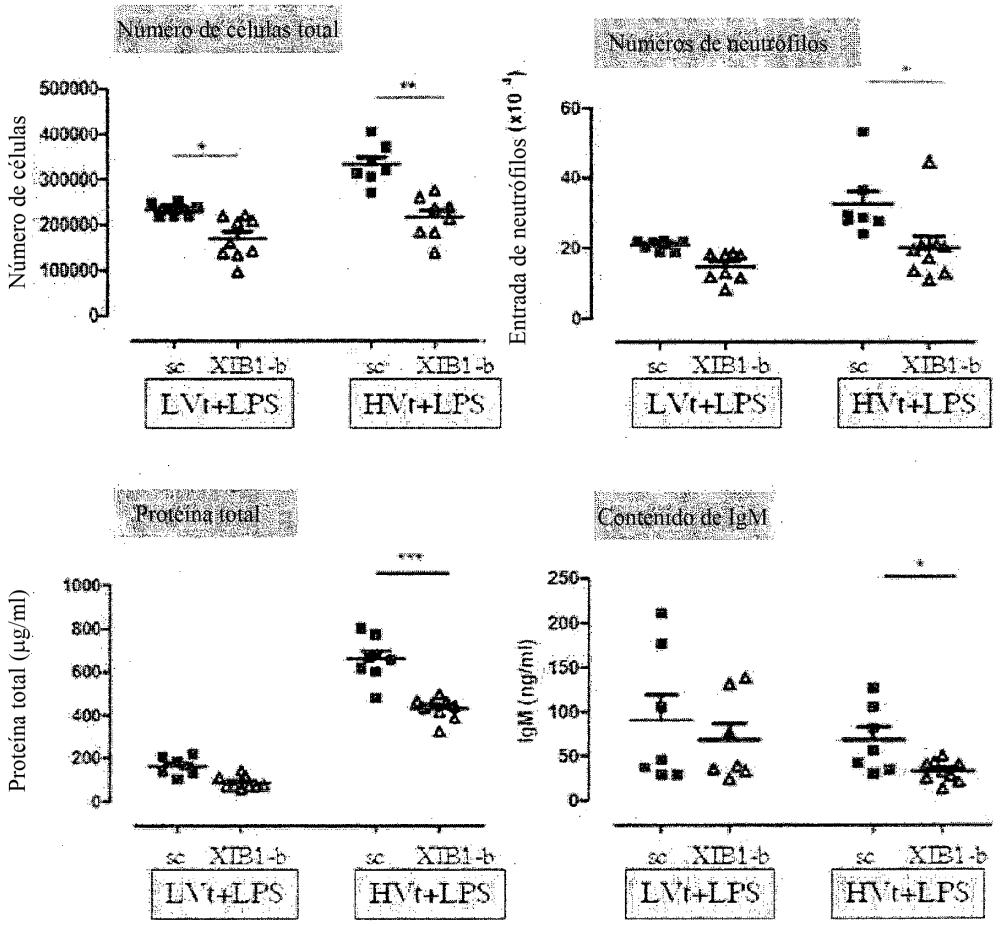
12. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 o el polinucleótido de la reivindicación 11 para su uso como una sustancia farmacéutica.

13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 y/o el polinucleótido de la reivindicación 11, que opcionalmente comprende además un vehículo y/o diluyente farmacéuticamente aceptable.

14. El péptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, el polinucleótido de la reivindicación 11 o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad o trastorno asociado a una rotura localizada o sistémica de funciones de la barrera epitelial o endotelial, en el que dicha enfermedad o trastorno está seleccionado del grupo que consiste en lesión pulmonar aguda (LPA), lesión renal aguda (LRA), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar inducida por el respirador (LPIR), síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS), septicemia, quemaduras, síndrome de disfunción multiorgánica (SDMO) y edema.

15. El péptido de la reivindicación 12 o 14, el polinucleótido de la reivindicación 12 o 14 o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 o 14, en el que la vía de administración es parenteral u oral.

Figura 1


Número de células total
Número de células
500000
400000
300000
200000
100000
0
*
**
sc
XIB1-b
LVt+LPS
HVt+LPS
Números de neutrófilos
Entrada de neutrófilos (x10 4)
60
40
20
0
*
Proteína total
Proteína total (µg/ml)
1000
800
600
400
200
0
***
Contenido de IgM
IgM (ng/ml)
250
200
150
100
50
0
*