

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 514 322**

51 Int. Cl.:

A61K 38/34 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.04.2011** **E 11002917 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.08.2014** **EP 2508198**

54 Título: **Péptidos para suprimir reacciones de inflamación en hemodiálisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.10.2014

73 Titular/es:

**FRESENIUS MEDICAL CARE DEUTSCHLAND
GMBH (100.0%)
Else-Kröner-Strasse 1
61352 Bad Homburg , DE**

72 Inventor/es:

**PASSLICK-DEETJEN, JUTTA PROF. DR.;
FISLAGE, RAINER DR.;
CATANIA, ANNA DR.;
GATTI, STEFANO DR.;
KUHN, ANJA DR. y
STEPPAN, SONJA DR.**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 514 322 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos para suprimir reacciones de inflamación en hemodiálisis

5 La invención se refiere a una construcción S-L-P que comprende una superficie S de un soporte sólido, un grupo de unión L y un péptido P, en la que el péptido P está inmovilizado sobre la superficie S a través del grupo de unión L tal como se define en las reivindicaciones. También se da a conocer un conjugado L-P que comprende un grupo de unión L de este tipo y un péptido P de este tipo. El conjugado L-P puede emplearse como producto intermedio en la preparación de la construcción S-L-P. Además, la construcción S-L-P es útil en hemodiálisis, particularmente para la prevención y/o supresión de respuestas y procesos inflamatorios.

10 La diálisis es un método de limpieza de la sangre de un individuo cuando los riñones dejan de funcionar apropiadamente. La diálisis elimina la sal de más, los desechos y el agua del cuerpo, y ayuda a controlar la tensión arterial.

15 Se distinguen habitualmente dos tipos de diálisis: hemodiálisis y diálisis peritoneal. En la hemodiálisis, se conecta un paciente mediante tubos a un riñón artificial. Se bombea la sangre fuera del cuerpo al riñón artificial que filtra la sangre, y entonces se devuelve la sangre al cuerpo. En la diálisis peritoneal, se usa el revestimiento interior de la cavidad peritoneal del paciente como filtro natural. Se retiran los desechos por medio de un líquido, el dializado, que se lava dentro y fuera de la cavidad peritoneal en ciclos.

20 En la hemodiálisis, se usa un riñón artificial (hemodializador) para retirar desechos, productos químicos de más y líquido en exceso de la sangre. Para transferir la sangre de un paciente de diálisis al interior del riñón artificial, se requiere un acceso vascular. Se realiza un acceso común conectando una arteria a una vena debajo de la piel y creando así una fístula. Entonces se penetra la fístula, permitiendo el acceso a la sangre.

25 Ocasionalmente, se realiza un acceso por medio de un catéter, que se inserta en una vena grande en el cuello. Este tipo de acceso puede ser temporal, pero en muchos casos puede usarse para tratamiento a largo plazo. Como con cualquier tratamiento con catéter o acceso vascular, el catéter crea una comunicación directa entre el entorno interno aséptico de un paciente y el mundo exterior. Complicaciones comunes de esta comunicación son infecciones, inflamaciones y bloqueo trombotico o infiltrante del acceso.

30 La inflamación representa una complicación médica principal asociada con la diálisis. De hecho, aunque son numerosos los beneficios de la hemodiálisis y la diálisis peritoneal, muchas de las complicaciones asociadas con cada una pueden ser potencialmente mortales. Cada técnica tiene sus propias o similares complicaciones incluyendo, pero sin limitarse a, fallo de la ultrafiltración, conformidad, obesidad, aclaramiento y escasa conformidad del líquido.

35 La inflamación es un factor principal para la alta mortalidad en pacientes con nefropatía terminal (*end stage renal disease*, ESRD). Se considera que la inflamación desempeña un papel primordial en el daño arterial en pacientes de diálisis. Aunque los mecanismos precisos que conducen a este estado inflamatorio en ESRD no están claros, se comentan infección leve, exposición repetida a filtros para diálisis y productos de autooxidación como factores desencadenantes probables en estos pacientes (véanse C. Zocalli *et al.*, Blood purification, 2003, 21, 29-36; y P. Stenvinkel *et al.*, Semin. Dial., 2002, 15, 329-37).

Existe una demanda de métodos que provoquen menos inflamación en pacientes de hemodiálisis.

40 α -MSH (hormona estimulante de melanocitos) se deriva de una hormona precursora, concretamente proopiomelanocortina (POMC). El procesamiento postraducciona de POMC produce hormonas peptídicas tales como ACTH, α -MSH - γ -MSH y β -endorfina.

α -MSH tiene múltiples efectos sobre el huésped.

45 El efecto estimulante de α -MSH en células pigmentarias se ha conocido durante más de 50 años. Hallazgos más recientes indican que α -MSH controla la ingesta de alimento y secreciones exocrinas, modula la fiebre (véase D. B. Richards *et al.*, Peptides 1984, 5 (4), 815-7) y reacciones inflamatorias y tiene un efecto antimicrobiano (véase por ejemplo A. Catania *et al.*, J Leukoc Biol. 2000, 67 (2), 233-9). α -MSH induce la expresión de Fos en neuronas productoras de oxitocina supraópticas (N. Sabatier *et al.*, J. Neuroscience, 2003, 23 (32), 10351-8).

[Nle4-d-Phe7]- α -MSH (NDP-MSH) se ha descrito como un análogo de α -MSH estable a proteasas (véase T. K. Sawyer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, 77 (10), 5754-58).

Se ha mostrado que Ac-Lys-Pro-Val-NH₂ (KPV), el tripéptido terminal de α -MSH, que está N-acetilado y C-amidado

presenta casi el mismo efecto antiinflamatorio que α -MSH de longitud completa.

El documento WO 88/00833 da a conocer un tripéptido antipirético, que tiene la secuencia de aminoácidos lisina-prolina-valina, y un método para utilizar el tripéptido para reducir la fiebre y la inflamación en mamíferos.

5 El documento US 2009/0069242 describe análogos peptídicos de α -MSH, que presentan una eficacia aumentada en comparación con el péptido de α -MSH nativo.

Los documentos US 2005/0130901 y US 2006/0122121 se refieren a péptidos con actividad antimicrobiana. Los péptidos son péptidos octoméricos modificados a partir de α -MSH.

10 El documento WO 2004/004551 da a conocer una composición y un método para controlar la respuesta del huésped a trasplante e injerto de órganos y/o tejidos. α -MSH protege al órgano y tejido tras el trasplante controlando factores dentro del donante, el huésped y el órgano o tejido que va a trasplantarse.

Los documentos US 2010/143438 y WO 2010/129248 dan a conocer construcciones de S-L-alfa-MSH para su uso en el tratamiento de inflamación.

15 El documento WO 00/56353 se refiere a un sistema de acondicionamiento genitourinario que comprende un portador, al menos un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos de KPV o un equivalente biológicamente funcional de la misma; en el que el portador porta el polipéptido. El polipéptido puede incluir un dímero formado a partir de la secuencia de aminoácidos.

J. M. Kelly *et al.*, Peptides, 2006, 27, 431-7 dan a conocer que la hormona estimulante de melanocitos- α 10-13 (GKPV) inhibe la actividad de NF- κ B estimulada por el factor de necrosis tumoral- α .

20 La capacidad del dímero (CKPV)₂ para inhibir reacciones del huésped inducidas por endotoxinas sugiere que puede ser útil en el tratamiento de trastornos inflamatorios (S. Gatti *et al.*, J Surg Res, 2006, 131 (2), 209-14).

También se conocen la síntesis y la actividad del dímero [Ac-CKPV]₂ (véase A. Catania *et al.*, J Pept Res., 2005, 66 (1), 19-26).

25 Se sabe que las concentraciones de α -MSH están elevadas en pacientes en hemodiálisis crónica. Se observan concentraciones de hasta 30 ng/l mientras que pacientes sanos muestran concentraciones de hasta 25 ng/l sólo. La concentración de α -MSH está particularmente elevada cuando puede observarse simultáneamente una concentración elevada de endotoxina. Posiblemente, se induce liberación de α -MSH por citocinas con el fin de limitar su efecto (véase L. Airaghi *et al.*, Nephrol Dial Transplant, 2000, 15, 1212-6).

También se investigaron los efectos antiinflamatorios de tripéptidos relacionados con α -MSH *in vitro* e *in vivo* (Broska *et al.*, Endocrine reviews, 2008, 29 (5), 581-602).

30 El documento WO 03/094990 se refiere a oligo y polisacáridos que contienen el elemento estructural de azúcar N-acilglucosamina o N-acilgalactosamina, además del uso de los mismos para producir superficies hemocompatibles y métodos para recubrir superficies con dichos oligo y polisacáridos, que constituyen las sustancias precursoras de biosíntesis comunes de heparina, sulfatos de heparano y quitosano.

35 Los documentos US 2005/074485 y WO 2004/104019 dan a conocer una composición y un método de tratamiento en el que se usan péptidos antimicrobianos y antiinflamatorios, preferiblemente KPV o un dímero del mismo, para hemodiálisis y diálisis peritoneal en dializado y gel. Los péptidos antimicrobianos y antiinflamatorios pueden usarse en diálisis peritoneal para aumentar la diuresis. Otras realizaciones incluyen el uso de los péptidos antimicrobianos y antiinflamatorios en disoluciones de sellado usadas para catéteres y otros tubos de acceso vascular o tubos de acceso peritoneal.

40 Sin embargo, estas composiciones no son satisfactorias en cada sentido y existe una demanda de mejoras adicionales de la hemodiálisis.

Un objeto de la invención es proporcionar mejoras para la hemodiálisis y otros métodos en los que se guían líquidos corporales a través de circuitos extracorpóreos, particularmente con respecto a la aparición de inflamación.

Este objeto se consigue mediante el contenido de las reivindicaciones de la patente.

45 Se ha encontrado sorprendentemente que superficies que están modificadas con péptidos pequeños que tienen el

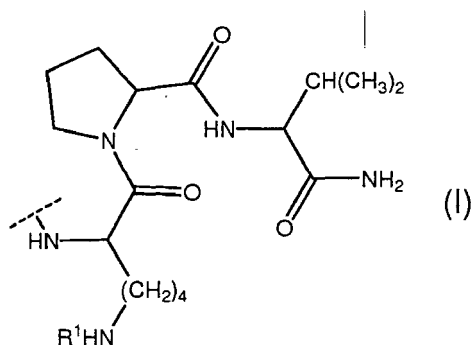
extremo C-terminal de KPV amidado y acilado son particularmente útiles en hemodiálisis con respecto a la prevención y/o supresión de inflamación.

Se ha encontrado que la invención también puede funcionar con α -MSH completa o fracciones de la misma. Para el fin de esta invención, también pueden reemplazarse péptidos que tienen el extremo C-terminal de KPV amidado y acilado por α -MSH o menos preferido por otras fracciones de la misma. Las fracciones pueden ser péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos que también está comprendida en α -MSH.

En comparación con α -MSH, dichos péptidos tienen varias ventajas. Son moléculas pequeñas y económicas que son adecuadas para su producción farmacéutica a gran escala. Parece que no muestran un efecto melanogénico pronunciado, muestran menos efectos secundarios adversos y debido a su tamaño molecular, son ventajosos para terapia local de varios trastornos inflamatorios.

En comparación con agentes inmunosupresores convencionales, disminuyen el riesgo de infecciones debido a su eficacia antiinflamatoria y antimicrobiana combinada.

Un primer aspecto de la invención se refiere a una construcción S-L-P que comprende una superficie S de un soporte sólido, un grupo de unión L y un péptido P, en la que el péptido P está inmovilizado sobre la superficie S a través del grupo de unión L, en la que el grupo de unión L comprende un resto poli(óxido de alquilen) y en la que el péptido P comprende un extremo C-terminal según la fórmula general (I)



en la que R^1 es -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , y

en la que la línea de puntos de la fórmula general (I) representa el resto de la construcción S-L-P.

La construcción según la invención comprende una superficie S de un soporte sólido, un grupo de unión L y un péptido P. Preferiblemente, la construcción S-L-P consiste en la superficie S de un soporte sólido, el grupo de unión L y el péptido P, es decir, no incluye constituyentes adicionales.

La superficie S del soporte sólido no está limitada particularmente, siempre que pueda inmovilizar el péptido P a través del grupo de unión L.

Preferiblemente, la superficie S está adaptada para ponerse en contacto con un líquido corporal, tal como sangre, suero y plasma.

En una realización particularmente preferida, la superficie S es hemocompatible.

Para el fin de la memoria descriptiva, hemocompatibilidad se define preferiblemente según la norma ISO 10993-4 que se refiere a pruebas acerca de los efectos de la puesta en contacto de la sangre con el producto o los compuestos sobre sangre o componentes de la sangre, directamente o indirectamente durante el uso rutinario.

La hemocompatibilidad se consigue preferiblemente dotando al soporte sólido de un recubrimiento externo, por ejemplo, una capa hemocompatible. La capa hemocompatible puede añadirse directamente sobre la superficie de un soporte sólido preferiblemente no hemocompatible o depositarse sobre otras capas bioestables y/o biodegradables. Pueden estar presentes capas bioestables y/o biodegradables y/o hemocompatibles adicionales encima de la capa hemocompatible.

El experto en la técnica conoce materiales hemocompatibles. Preferiblemente, la superficie S del soporte sólido se hace hemocompatible, entre otros, por la presencia del péptido P que se inmoviliza sobre la superficie S a través de grupo de unión L.

Se prefiere que al menos una capa bioestable esté presente debajo de la capa hemocompatible. Además, la capa hemocompatible puede recubrirse total y/o parcialmente con al menos una capa bioestable y/o biodegradable que se dispone por encima adicional.

Los ejemplos de sustancias biodegradables para la(s) capa(s) biodegradable(s) incluyen polivalero-lactonas, poli(ácido lactónico), poli-[épsilon]-decalactonas, poli(ácido glicólico), polilactidas, poliglicolidas, copolímeros de las polilactidas y poliglicolidas, poli-[épsilon]-caprolactona, poli(ácido hidroxibutanoico), polihidroxibutiratos, polihidroxisalvateratos, polihidroxibutirato-co-valeratos, poli(1,4-dioxano-2,3-dionas), poli(1,3-dioxano-2-ona), poli-paradioxanonas, polianhídridos tales como poli(anhídridos maleicos), polihidroximetacrilatos, fibrina, policianoacrilatos, poli(dimetilacrilatos de caprolactona), poli(ácido β -maleico), poli(butilacrilatos de caprolactona), polímeros de múltiples bloques tales como por ejemplo de oligocaprolactonadióles y oligodioxanonadióles, polímeros de múltiples bloques de poliéter-éster tales como por ejemplo PEG y poli(tereftalatos de butileno), polipivotolactonas, carbonatos de trimetilo-poli(ácido glicólico), policaprolactona-glicolidas, poli(glutamato de γ -etilo), poli(DTH-iminocarbonato), poli(DTE-co-DT-carbonato), poli(iminocarbonato de bisfenol-A), poliiminocarbonatos, poliortoésteres, carbonatos de trimetilo-poli(ácido glicólico), poli(carbonatos de trimetilo), poli(N-vinil)-pirrolidona, poli(alcoholes vinílicos), poliesteramidas, polifosfoésteres, poliésteres glicolados, polifosfacenos, poli[p-carboxifenoxi]propano], poli(ácido hidroxipentanoico), polianhídridos, poli(óxido de etileno-óxido de propileno), poliuretanos blandos, poliuretanos con residuos de aminoácido en la estructura principal, poliéter-ésteres tales como poli(óxido de etileno), polialquinoxalatos, poliortoésteres así como sus copolímeros, carragenanos, lípidos, fibrinógeno, almidón, colágeno, polímeros a base de proteínas, poliaminoácidos, poliaminoácidos sintéticos, ceína, ceína modificada, polihidroxialcanoatos, ácido actínico, ácido péctico, fibrina y caseína modificadas y no modificadas, sulfato de carboximetilo, albúmina, además ácido hialurónico, quitosano y sus derivados, sulfatos de heparano y sus derivados, heparinas, sulfato de condroitina, dextrano, β -ciclodextrinas, copolímeros con PEG y polipropilenglicol, goma arábica, goma guar, gelatina, colágeno, colágeno-N-hidroxisuccinimida, lípidos, fosfolípidos, modificaciones y copolímeros y/o mezclas de las sustancias mencionadas anteriormente.

Los ejemplos de sustancias bioestables para la(s) capa(s) bioestable(s) incluyen poli(ácido acrílico) y poliácrilatos tales como poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de butilo), poliácrilamida, poliácridonitrilos, poliamidas, polieteramidas, polietilenamina, poliimidas, policarbonatos, poli-carbouretanos, poli(vinil cetonas), poli(halogenuros de vinilo), poli(halogenuros de vinilideno), poli(vinil éteres), poliisobutilenos, poli(aromatos de vinilo), poli(ésteres vinílicos), polivinilpirrolidonas, polioximetilenos, poli(óxido de tetrametileno), polietileno, polipropileno, politetrafluoroetileno, poliuretanos, polieteruretanos, silicona-polieteruretanos, silicona-poliuretanos, silicona-policarbonato-uretanos, elastómeros de poliolefina, poliisobutilenos, gomas de EPDM, fluorosiliconas, carboximetilquitosanós, poliarileteretercetonas, polieteretercetonas, poli(tereftalato de etileno), polivaleratos, carboximetilcelulosa, celulosa, rayón, triacetatos de rayón, nitratos de celulosa, acetatos de celulosa, hidroxietilcelulosa, butiratos de celulosa, acetato-butiratos de celulosa, copolímeros de acetato de etilvinilo, polisulfonas, resinas epoxídicas, resinas ABS, gomas de EPDM, siliconas como polisiloxanos, polidimetilsiloxanos, polivinilhalógenos y copolímeros, éteres de celulosa, triacetatos de celulosa, quitosanós y copolímeros y/o mezclas de estas sustancias.

En una realización preferida, la superficie S contiene al menos un área con una concentración de superficie de la proteína P de al menos $1,0 \text{ nmol/cm}^2$, más preferiblemente al menos $2,0 \text{ nmol/cm}^2$, todavía más preferiblemente al menos 5 nmol/cm^2 , aún más preferiblemente al menos 10 nmol/cm^2 , lo más preferiblemente al menos 25 nmol/cm^2 y en particular al menos 50 nmol/cm^2 . Preferiblemente, dicha área tiene al menos $1,0 \text{ cm}^2$ de tamaño.

La superficie S es la superficie de un soporte sólido. El soporte sólido no está limitado particularmente. Preferiblemente, el soporte sólido es un dispositivo médico, por ejemplo un componente de un circuito extracorpóreo, preferiblemente de un sistema o un componente del mismo adaptado para hemodiálisis, hemofiltración, plasmáfesis, aféresis, oxigenación por membrana extracorpórea o circulación sanguínea asistida.

En una realización preferida la superficie S del soporte sólido es adecuada para el contacto a corto o a largo plazo con la sangre o productos sanguíneos. Los ejemplos de soportes sólidos incluyen dispositivos médicos tales como prótesis, órganos, vasos, aortas, válvulas cardíacas, tubos, piezas de repuesto para órganos, implantes, fibras, fibras huecas, endoprótesis, agujas huecas, jeringuillas, membranas, artículos enlatados, recipientes para sangre, placas titrimétricas, marcapasos, medios de adsorción, medios para cromatografía, columnas de cromatografía, dializadores, piezas de conexión, sensores, válvulas, cámaras centrífugas, recuperadores, endoscopios, filtros y cámaras de bombas. Se prefieren particularmente los dializadores, especialmente sus componentes, particularmente membranas para diálisis.

El soporte sólido puede estar compuesto por material inorgánico y/u orgánico, metal o polímeros. Polímeros adecuados pueden ser termoplásticos y el experto en la técnica los conoce.

El soporte sólido y la superficie S, respectivamente, pueden adoptar cualquier forma, por ejemplo plana, convexa, cóncava y similares. Cuando el soporte sólido es una membrana para diálisis, puede ser, por ejemplo, fibroso,

similar a un tejido, una fibra hueca o una membrana plana.

El experto en la técnica conoce grupos de unión L que son adecuados para inmovilizar un péptido P sobre una superficie S adecuada. En este sentido puede hacerse referencia por ejemplo a G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, segunda edición, Academic Press 2008; F. Zaragoza Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions*, Wiley-VCH; 2ª edición 2002; J. M. Guisan, *Immobilization Of Enzymes And Cells (Methods in Biotechnology)*, Humana Press; 2ª edición 2006; J.A. Camarero, *Biopolymers*. 2008, 90 (3), 450-8.

La naturaleza química del grupo de unión L no está limitada particularmente. Grupos de unión L típicos comprenden al menos un extremo distal que está orientado hacia el péptido P y al menos un extremo proximal que está orientado hacia la superficie S.

- 10 El grupo de unión L puede tener cualquier distancia de extremo a extremo desde el extremo distal hasta el extremo proximal que sea adecuada con el fin de inmovilizar el péptido P sobre la superficie S del soporte sólido. Longitudes típicas (promedio) están en el intervalo de desde unos pocos nanómetros hasta varios nanómetros o más.

- 15 Preferiblemente, el grupo de unión L es una molécula orgánica. Puede contener una cadena carbono-carbono no interrumpida entre el extremo distal y el extremo proximal. Sin embargo, preferiblemente entremedias de al menos algunos de los átomos de carbono de la cadena hay heteroátomos que se seleccionan preferiblemente de manera independiente de Si, N, S y O.

Preferiblemente, el grupo de unión L es sustancialmente lineal. Preferiblemente, el grupo de unión L comprende un resto que está compuesto por unidades de repetición, como en un polímero u oligómero. Por ejemplo, cuando el grupo de unión L comprende un resto polietilenglicol, las unidades de repetición son $-(O-CH_2CH_2)_x-$.

- 20 El grupo de unión L puede derivarse de biomoléculas, tales como péptidos, o de productos sintéticos, tales como polialquilenglicoles, por ejemplo, polietilenglicoles o polipropilenglicoles.

- 25 El grupo de unión L puede estar compuesto por varios segmentos que difieren entre sí en naturaleza química pero que están unidos covalentemente entre sí. Por ejemplo, un primer segmento del grupo de unión L puede ser peptídico y un segundo segmento del grupo de unión L que está unido covalentemente a dicho primer segmento puede ser un polialquilenglicol o un poli(óxido de alqueno).

Preferiblemente, el grupo de unión L comprende un segmento de o resto poli(alquilenglicol) o poli(óxido de alqueno).

En una realización preferida, el grupo de unión L no incluye ningún residuo de α -aminoácido, es decir, el grupo de unión no es peptídico.

- 30 En una realización preferida, el peso molecular global del grupo de unión L está dentro del intervalo de desde 500 g/mol hasta 2.000.000 g/mol, más preferiblemente de 750 g/mol a 1.000.000 g/mol, todavía más preferiblemente de 1000 g/mol a 500.000 g/mol, aún más preferiblemente de 1250 g/mol a 100.000 g/mol, lo más preferiblemente de 1500 g/mol a 50.000 g/mol y en particular de 2000 g/mol a 10.000 g/mol.

- 35 En una realización preferida, la superficie S comprende grupos carboxilo ($-COOH$) libres que se activan mediante el uso de EDC u otros compuestos de activación. Posteriormente, esta superficie S activada se pone preferiblemente en contacto con el péptido P modificado con PEG para producir el enlace covalente correspondiente.

- 40 El grupo de unión L preferiblemente está unido covalentemente a la superficie S, por ejemplo mediante un enlace éster, enlace éter, enlace amida, enlace tioéter y similares. Pueden conseguirse inmovilizaciones quimioselectivas, por ejemplo, mediante unión de grupo amino a aldehído, unión de grupo aminooxiacetilo a glioxililo, unión de residuo de cisteína a tioéter, unión de residuo de ciclopentadieno a benzoquinona, y similares.

- 45 Están disponibles comercialmente soportes sólidos que portan en sus superficies S grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar con un grupo funcional compatible en el extremo proximal del grupo de unión L. Por ejemplo, los soportes sólidos pueden portar en sus superficies S grupos funcionales reactivos seleccionados del grupo que consiste en aminas, tioles, aldehídos, ácidos carboxílicos, grupos aminooxiacetilo, grupos glioxililo, grupos tioéter, grupos ciclopentadieno, benzoquinonas, trialcóxisilanos, y similares.

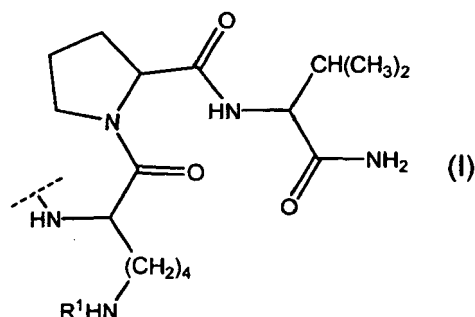
El experto en la técnica también conoce métodos para introducir dichos grupos funcionales reactivos en las superficies S de soportes sólidos.

Preferiblemente, el grupo de unión L y la superficie S del soporte sólido están unidos entre sí sólo mediante enlaces

covalentes, de manera que entre el péptido P y la superficie S existe una cadena continua de enlaces covalentes, cadena que puede ser lineal o ramificada.

También es posible que el grupo de unión L esté unido de manera no covalente a la superficie S, por ejemplo mediante interacción biotina-(estrept)avidina y similares. En estas circunstancias el soporte sólido porta en su superficie S, por ejemplo, moléculas de biotina que están unidas a la superficie S mediante métodos convencionales. El extremo proximal del grupo de unión L a su vez porta un grupo (estrept)avidina compatible de manera que puede formarse un complejo molecular, inmovilizando de este modo el grupo de unión L en la superficie S. Un experto en la técnica reconoce que puede intercambiarse la ubicación de la biotina y la (estrept)avidina en la superficie S y el grupo de unión L. Puede conseguirse fácilmente un marcaje con biotina, por ejemplo, mediante pegilación de biotina.

- 10 El péptido P comprende un extremo C-terminal según la fórmula general (I)



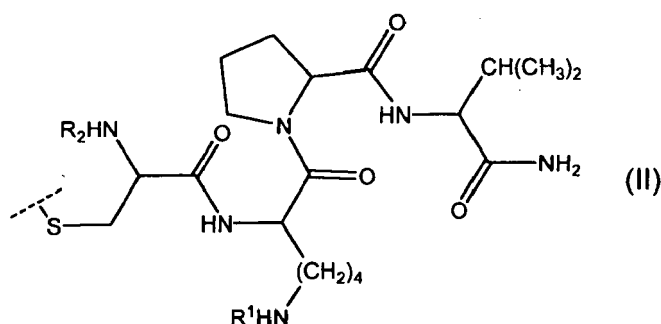
en la que R^1 es -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} .

La fórmula general (I) representa el tripéptido -Lys-Pro-Val que está amidado en su extremo C-terminal (-Lys-Pro-Val-NH₂) y puede estar acilado, preferiblemente acetilado, en la función amino de la cadena lateral de lisina.

- 15 Para el fin de la memoria descriptiva, “-|” representa el resto de la construcción S-L-P.

Para el fin de la memoria descriptiva, “alifato” incluye residuos de alquilo, alquenilo y alquinilo lineales o ramificados. Preferiblemente, -C(=O)-alifato C_{1-8} es acetilo.

En una realización preferida, el péptido P comprende un extremo C-terminal según la fórmula general (II)



- 20 en la que R^1 y R^2 son independientemente entre sí -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} .

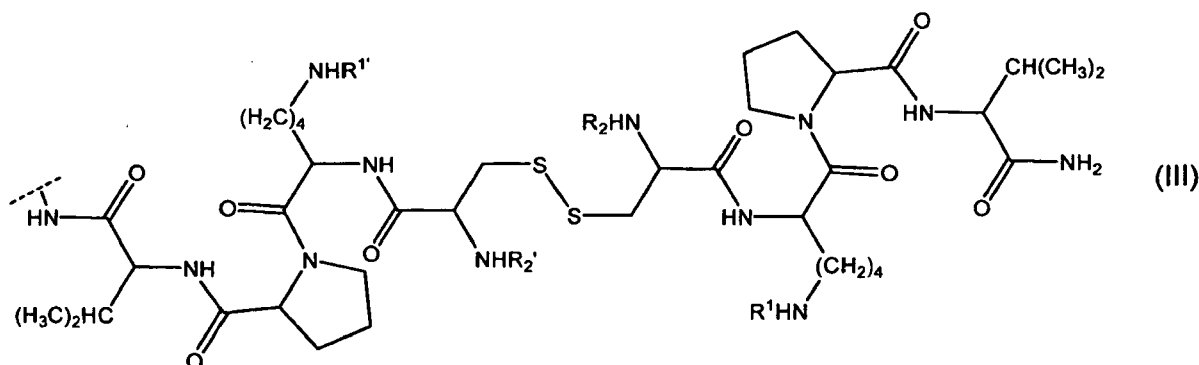
La fórmula general (II) representa el tetrapéptido -Cys-Lys-Pro-Val que está amidado en su extremo C-terminal (-Cys-Lys-Pro-Val-NH₂) y puede estar acilado, preferiblemente acetilado, en la función amino de la cadena lateral de lisina y en el extremo N-terminal de cisteína.

- 25 El péptido P está compuesto por aminoácidos proteinogénicos que pueden tener, independientemente entre sí, configuración D o L. Preferiblemente, el péptido P consiste en residuos de α -aminoácido que tienen configuración L.

En una realización preferida, el péptido P incluye no más de 4 residuos de α -aminoácido unidos directamente entre sí a través de enlaces peptídicos.

En otra realización preferida, el péptido P incluye dos subsecuencias que incluyen cada una no más de 4 residuos de α -aminoácido unidos directamente entre sí a través de enlaces peptídicos, en el que dichas dos subsecuencias están unidas entre sí a través de un enlace no peptídico, preferiblemente a través de un enlace -S-S- cistina de dos cisteínas.

- 5 En una realización preferida, el péptido P comprende un dímero según la fórmula general (III)



en la que R^1 , $R^{1'}$, R^2 y $R^{2'}$ son independientemente entre sí -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , preferiblemente acetilo.

- 10 La fórmula general (III) representa un dímero del tetrapéptido -Cys-Lys-Pro-Val que está amidado en el extremo C-terminal (-Val-Pro-Lys-Cys-S-S-Cys-Lys-Pro-Val-NH₂) y puede estar acilado en las funciones amino de la cadena lateral de las lisinas y los extremos N-terminales de las cisteínas.

El péptido P puede prepararse mediante síntesis de péptidos en fase sólida y purificarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa.

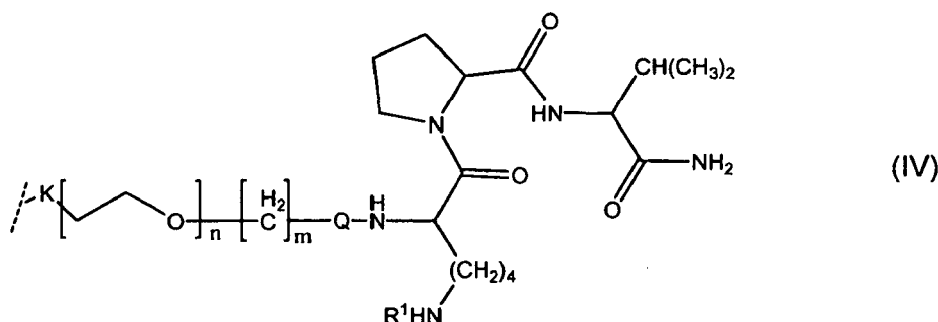
- 15 El grupo de unión L preferiblemente está unido covalentemente al péptido P, por ejemplo mediante un enlace éster, enlace éter, enlace amida, enlace tioéter y similares. Puede conseguirse una unión de este tipo, por ejemplo, mediante unión de grupo amino a aldehído, unión de residuo de cisteína a tioéster, unión de amida y similares.

- 20 Están disponibles comercialmente grupos de unión L que portan en sus extremos distales grupos funcionales reactivos que pueden reaccionar con un grupo funcional compatible en el péptido P. Por ejemplo, los grupos de unión L pueden portar en sus extremos distales grupos funcionales reactivos seleccionados del grupo que consiste en aminas, tioles, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, grupos aminooxiacetilo, grupos glioxililo, grupos tioéster y similares.

- 25 También es posible que el grupo de unión L esté unido de manera no covalente al péptido P, por ejemplo mediante interacción biotina-(estrept)avidina y similares. En estas circunstancias el grupo de unión L porta en su extremo distal, por ejemplo, moléculas de biotina que se están unidas al grupo de unión L mediante métodos convencionales. El péptido P a su vez porta un grupo (estrept)avidina compatible de manera que puede formarse un complejo molecular, uniendo de este modo el péptido P al extremo distal del grupo de unión L. Un experto en la técnica reconoce que puede intercambiarse la ubicación de la biotina y la (estrept)avidina en el péptido P y el grupo de unión L.

- 30 Preferiblemente, cada grupo de unión L porta un péptido P. Sin embargo, también es posible que más de un péptido P esté unido a un único grupo de unión L. Esto puede conseguirse, por ejemplo, por medio de grupos de unión L ramificados que portan un extremo proximal unido a la superficie S del soporte sólido y más de un extremo distal, por ejemplo 2, 3 ó 4 extremos distales, unidos cada uno a un péptido P.

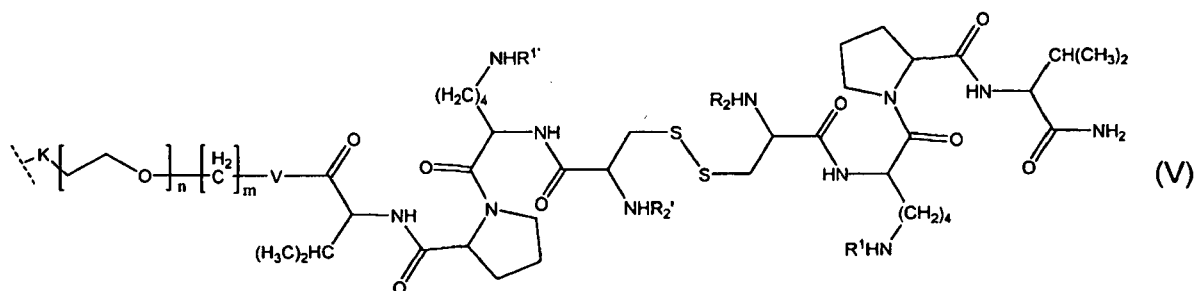
En una realización preferida, la construcción S-L-P según la invención comprende una subestructura -L-P según la fórmula general (IV):



en la que

5 R^1 es -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , preferiblemente acetilo; Q es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -NH-C(=O)-, -NH-C(=S)- y -NH-C(=NH)-; K es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -NH-, -O-, -S-, -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -NH-C(=O)-, -NH-C(=S)-, -NH-C(=NH)-, -NH-C(=O)-O-, -NH-C(=O)-NH-, -O-C(=O)-O- o -Si(R')₂-, en el que R' es -alquilo C_{1-6} u -O-alquilo C_{1-6} ; n es un número entero de desde 0 hasta 250, preferiblemente de 1 a 25, más preferiblemente de 2 a 10; y m es un número entero de desde 0 hasta 12, preferiblemente 1, 2 ó 3.

10 En una realización preferida, la construcción S-L-P según la invención comprende una subestructura -L-P según la fórmula general (V):

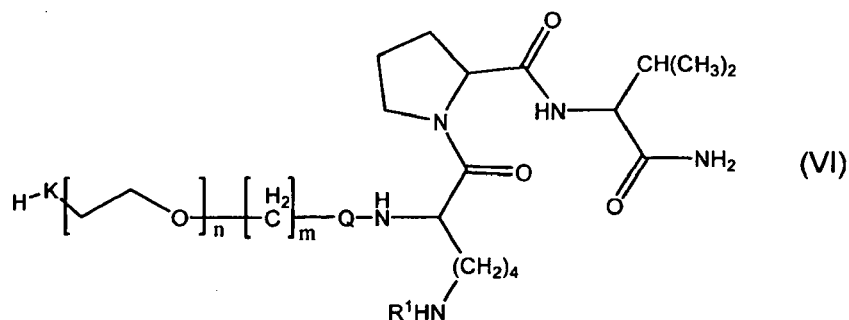


15 en la que R^1 , R^2 y R^3 son independientemente entre sí -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , preferiblemente acetilo; V es un grupo funcional seleccionado de -O- y -NH-, preferiblemente -NH-; K es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -NH-, -O-, -S-, -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -NH-C(=O)-, -NH-C(=S)-, -NH-C(=NH)-, -NH-C(=O)-O-, -NH-C(=O)-NH-, -O-C(=O)-O- o -Si(R')₂-, en el que R' es -alquilo C_{1-6} u -O-alquilo C_{1-6} ; n es un número entero de desde 0 hasta 250, preferiblemente de 1 a 25, más preferiblemente de 2 a 10; y m es un número entero de desde 0 hasta 12, preferiblemente 1, 2 ó 3.

Un aspecto adicional de la invención se refiere a un conjugado L-P que comprende un grupo de unión L tal como se definió anteriormente unido covalentemente a un péptido P tal como se definió anteriormente.

20 Preferiblemente, el grupo de unión L comprende un resto polialquilenglicol, se prefiere particularmente un resto polietilenglicol (PEG) de modo que el conjugado L-P pueda considerarse preferiblemente como un péptido P tal como se definió anteriormente, que está pegilado por el resto polietilenglicol del grupo de unión L.

El conjugado L-P según la invención puede tener una estructura según la fórmula general (VI):



en la que

R^1 es -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , preferiblemente acetilo;

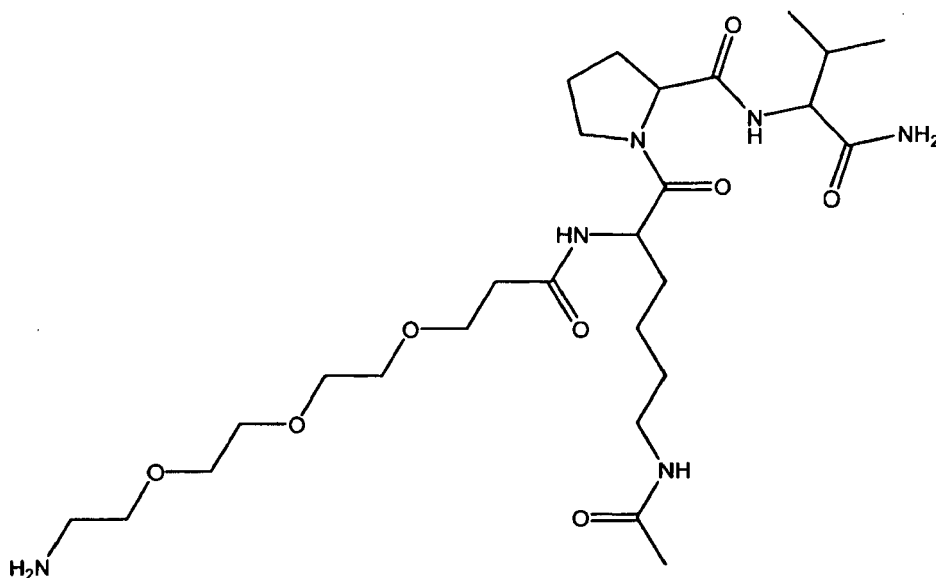
5 Q es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -C(=O)-, -C(=S)-, -C(=NH)-, -NH-C(=O)-, -NH-C(=S)- y -NH-C(=NH)-;

K es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -alquileo C_{1-8} -, -NH-, -O-, -S-, -C(=O)- o -C(=O)O-;

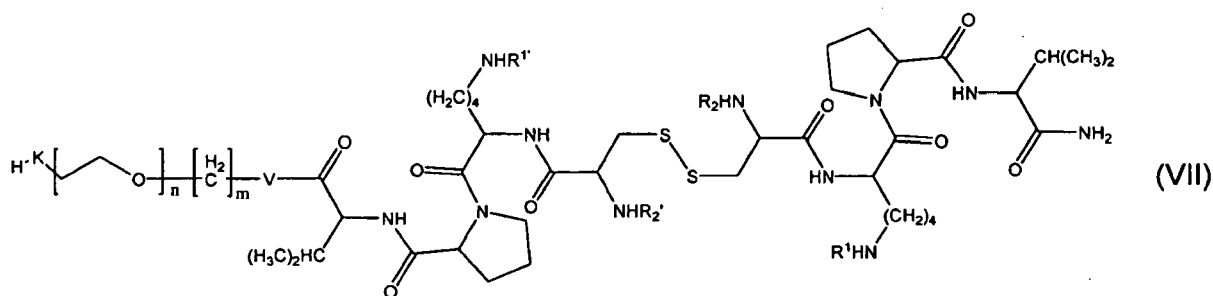
n es un número entero de desde 0 hasta 250, preferiblemente de 1 a 25, más preferiblemente de 2 a 10; y m es un número entero de desde 0 hasta 12, preferiblemente 1, 2 ó 3.

10 Para el fin de la memoria descriptiva, grupos funcionales bivalentes que tienen dos posibilidades de incorporarse en una fórmula general en dos direcciones diferentes, por ejemplo -NH-C(=O)-, pueden incorporarse en ambas direcciones alternativamente.

En una realización particularmente preferida, R^1 es acetilo, Q es -C(=O)-, m es 2, n es 3 y K es -NH-, de manera que el conjugado L-P tiene la siguiente estructura:



15 En otra realización preferida, el conjugado L-P según la invención tiene una estructura según la fórmula general (VII):



en la que

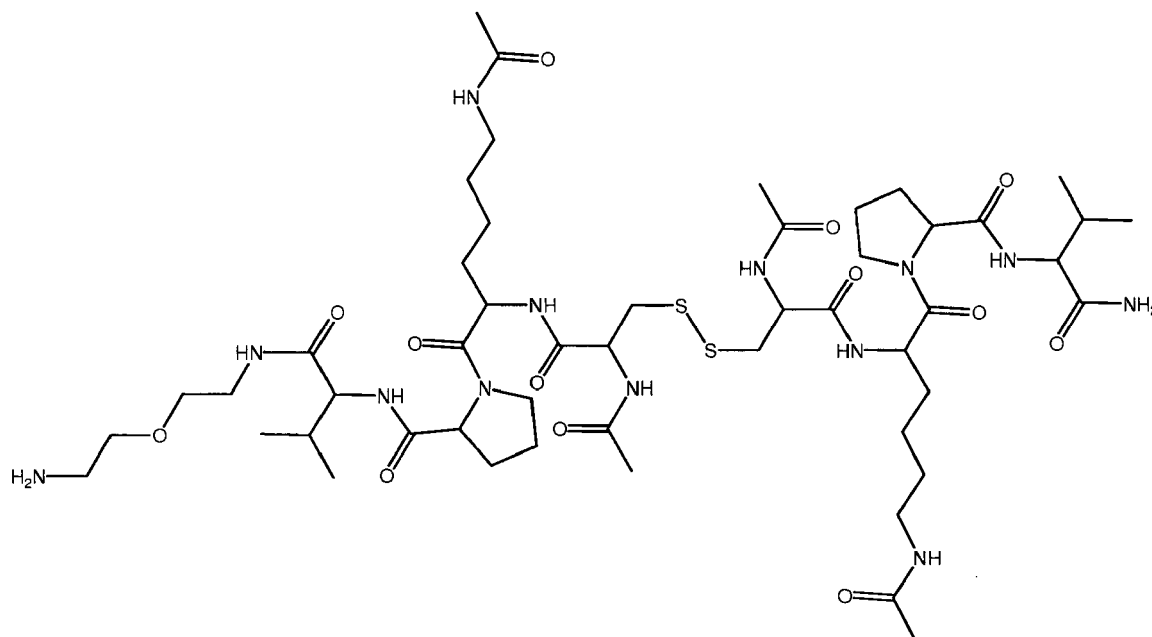
R^1 , $R^{1'}$, R^2 y $R^{2'}$ son independientemente entre sí -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , preferiblemente acetilo;

V es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -O- y -NH-, preferiblemente -NH-;

5 K es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -alquileo C_{1-8} -, -NH-, -O-, -S-, -C(=O)- o -C(=O)O-;

n es un número entero de desde 0 hasta 250, preferiblemente de 1 a 25, más preferiblemente de 2 a 10; y m es un número entero de desde 0 hasta 12, preferiblemente 1, 2 ó 3.

En una realización particularmente preferida, R^1 , $R^{1'}$, R^2 y $R^{2'}$ son acetilo, V es -NH-, m es 2, n es 1 y K es -NH-, de manera que el conjugado L-P tiene la siguiente estructura:



El conjugado L-P según la invención puede emplearse como producto intermedio en la preparación de la construcción S-L-P según la invención uniendo el conjugado L-P a la superficie S del soporte sólido en métodos apropiados (véase a continuación).

15 Disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Otros excipientes adecuados son agua, solución salina, dextrosa, manitol, lactosa, lecitina, albúmina, glutamato de sodio, clorhidrato de cistina o similares. Además, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden contener cantidades minoritarias de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes, agentes de tamponamiento del pH y similares. Si se desea, pueden usarse preparaciones de potenciación de la absorción (por ejemplo, liposomas).

20 En otra realización preferida, la composición farmacéutica se formula para su administración mediante un circuito extracorpóreo, tal como un circuito de diálisis. En esta realización, la composición farmacéutica se añade por

ejemplo dentro del circuito en el dializador y se administra al sujeto a través del circuito extracorpóreo.

El experto en la técnica conoce composiciones farmacéuticas adecuadas que son adecuadas para inyección o infusión. En este sentido, por ejemplo, puede hacerse referencia en su totalidad a K. H. Bauer *et al.*, Lehrbuch der Pharmazeutischen Technologie [Libro de texto de Tecnología Farmacéutica], WVG Stuttgart 1999. Composiciones farmacéuticas que son adecuadas para inyección son habitualmente disoluciones, emulsiones o suspensiones estériles, que se preparan disolviendo, emulsionando o suspendiendo el principio activo y opcionalmente excipientes adicionales en agua, en un líquido no acuoso adecuado que no tiene que ser estéril si esto está justificado o en una mezcla de estos vehículos.

Composiciones farmacéuticas que son adecuadas para infusión son habitualmente emulsiones o disoluciones acuosas, estériles con agua como fase continua.

Las composiciones farmacéuticas para inyección o infusión pueden contener opcionalmente excipientes adicionales. Excipientes de este tipo son preferiblemente solubilizantes, sustancias para isotonzación, tampones, antioxidantes, agentes quelantes, conservantes y emulsionantes.

Las composiciones farmacéuticas particularmente preferidas incluyen disoluciones de sellado, geles y dializados para el cuidado del catéter y la infección del sitio de la herida. Una disolución de sellado es un líquido usado en un catéter u otro acceso al cuerpo del paciente deseado. Contiene una sustancia que se elige por su capacidad para resistir la coagulación, el bloqueo y otras alteraciones. Un dializado es un líquido usado para el intercambio de líquidos en la diálisis peritoneal. Diuresis se refiere a un gradiente osmótico creado con el fin de limitar la reabsorción de agua.

En diferentes realizaciones de la invención, los dializados contienen preferiblemente glucosa, cloruro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, glucosa y/o el conjugado L-P en al menos aproximadamente el intervalo de milimolar a nanomolar tal como de 1×10^{-3} a 1×10^{-9} mol/l y al menos de aproximadamente 2×10^{-3} a 2×10^{-11} mol/l y concentraciones entremedias. Es importante indicar que la concentración de glucosa puede variar con las necesidades de un paciente individual. El conjugado L-P se suministra preferiblemente en viales estériles liofilizados y se añade al líquido a través de técnicas asépticas convencionales tales como resuspensión del péptido liofilizado y con agua estéril, extrayendo la mezcla en una jeringuilla de tamaño apropiado e inyectando la mezcla en el líquido.

Para fines de conservación, el conjugado L-P puede mantenerse seco hasta el momento de uso. También se contempla que el dializado pueda contener el conjugado L-P en disolución listo para diálisis peritoneal.

Para cumplir los requisitos de ultrafiltración de pacientes en diálisis peritoneal, el dializado peritoneal se administra normalmente de manera hiperosmolar en relación con el plasma para crear un gradiente osmótico que favorece el movimiento neto de agua al interior de la cavidad peritoneal; esta es la naturaleza de la capacidad de diálisis peritoneal para realizar la limpieza. En dializados peritoneales disponibles comercialmente, el azúcar glucosa sirve como agente osmótico que potencia la ultrafiltración. Las concentraciones disponibles oscilan entre el 1,5% en peso y el 4,25% en peso de dextrosa o glucosa.

En una realización, el conjugado L-P puede usarse como coadyuvante para dializados disponibles comercialmente en los que puede añadirse el conjugado L-P al dializado.

También están disponibles comercialmente disoluciones de sellado. "Sellos de heparina" son las disoluciones de sellado más comunes en catéteres en general y la heparina es un componente común de disoluciones de sellado en diálisis. En otra realización de la invención, se usa una disolución de sellado que contiene péptidos antimicrobianos y antiinflamatorios tanto para diálisis peritoneal como hemodiálisis. Se contemplan anticoagulantes parenterales tales como heparina, danaparoides y lepirudina para su uso en la invención. Una disolución de sellado puede contener el conjugado L-P preferiblemente en una cantidad en el intervalo de cantidades milimolares a nanomolares.

Para el cuidado del catéter, el conjugado L-P puede mezclarse en una composición con un portador biológicamente compatible, no tóxico, antes de la administración. Habitualmente, ésta será una disolución acuosa, tal como solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato (PBS), disolución de Ringer, lactato de Ringer o cualquier disolución fisiológicamente aceptable isotónica para su administración mediante el/la

Un aspecto adicional de la divulgación se refiere a un procedimiento para la fabricación de la construcción S-L-P según la invención que comprende la etapa de unir un péptido P tal como se definió anteriormente a una superficie S de un soporte sólido tal como se definió anteriormente a través de un grupo de unión L tal como se definió anteriormente.

En una realización preferida, el procedimiento según la invención comprende la etapa de unir un conjugado L-P tal como se definió anteriormente a una superficie S de un soporte sólido tal como se definió anteriormente.

5 En el procedimiento según la presente divulgación, el extremo proximal del grupo de unión L porta un grupo funcional que está adaptado para la inmovilización covalente o no covalente del grupo de unión L en la superficie S. Para este fin, la superficie S porta normalmente un grupo funcional que es compatible con el grupo funcional en el extremo proximal del grupo de unión L de manera que puede conseguirse una unión estable, opcionalmente tras la activación química de uno o ambos de los grupos funcionales.

El experto en la técnica conoce grupos funcionales y métodos de activación adecuados y se han descrito anteriormente con respecto al grupo de unión L y la superficie S, respectivamente.

La construcción S-L-P según la invención es útil para diálisis tal como hemodiálisis y diálisis peritoneal, hemofiltración, plasmaféresis, aféresis, oxigenación por membrana extracorpórea o circulación sanguínea asistida.

10 En una realización preferida, se usa para prevenir y/o suprimir la inflamación, preferiblemente en pacientes durante diálisis, hemofiltración, plasmaféresis, aféresis, oxigenación por membrana extracorpórea o circulación sanguínea asistida, preferiblemente en pacientes que padecen ESRD.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero no debe interpretarse que limitan su alcance.

Ejemplo 1:

15 Estimulación *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) humanas

Se aislaron CMSP de voluntarios varones sanos (n = 5) y se estimularon tal como se indica a continuación para simular un entorno urémico e inflamatorio comparable a pacientes (preincubación con LPS durante 3 horas).

Material y métodos

Para la estimulación de CMSP, se eligieron las siguientes concentraciones:

- 20
- LPS 1 ng/ml solo
 - α -MSH
 - 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M
 - Peg-KPV (tripéptido pegilado)
 - 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M

25 El procedimiento de estimulación fue tal como se describe a continuación:

Preincubación con LPS	Coestimulación LPS + Péptidos
sí 3 h	24 h
no -	24 h

Se incubaron todas las células durante 24 h y se centrifugaron a 1700 rpm y se usaron los sobrenadantes para la medición mediante ELISA de TNF- α según protocolos del fabricante.

Resultados

30 Se resumen los resultados de la preestimulación en la siguiente tabla y se representan adicionalmente en las figuras 1A y 1B:

	TNF- α	Preincubación de 3 h con LPS							
		Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6	VM+DE	DE	%
c	c	4808	4690	4400	3157	4897	4390,4	714,521028	100,00
α -MSH de Sigma	1	5005	4345	3968	2070	4286	3934,8	1108,54801	89,62
	10	4193	3883	3674	1799	4356	3581	1030,84262	81,56
	100	3009	2886	2073	942	2069	2395,8	906,537754	54,57
KPV [μ M]	1	4025	4554	3541	2301	4299	3744	889,739288	85,28
	10	4126	4387	3666	2209	3949	3667,4	856,500029	83,53
	100	3542	5022	2886	1931	3731	3222,4	833,825102	73,40
	1000	no realizado	1816	1494	1054	2482	1711,5	601,166366	38,98
Peg-KPV	1	4082	4092	6032	3241	5201	4529,5	1090,9071	103,17
	10	4129	4265	5243	2875	4599	4222,2	867,392184	96,17
	100	4185	3610	4993	2435	3859	3816,4	931,790642	86,93
	1000	no realizado	1647	2224	2467	2467	1869	596,454525	42,57

Se resumen los resultados de la incubación conjunta en la siguiente tabla y se representan adicionalmente en las figuras 2A y 2B:

	TNF- α	LPS + péptido simultáneamente							
		Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6	VM+DE	DE	%
c	c	4463	5268	4749	2207	4316	4200,6	1172,25181	100,00
α -MSH de Sigma	1	4098	3273	3116	1319	3100	2981,2	1015,82267	70,97
	10	3734	2776	2568	1237	2638	2590,6	891,168783	61,67
	100	1207	2337	1248	713	1386	1380,2	593,368941	32,86

(continuación)

	TNF- α	LPS + péptido simultáneamente							
		Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6	VM+DE	DE	%
KPV [μ M]	1	3426	3955	3702	1893	3541	3303,4	813,046309	78,64
	10	3154	3907	3369	1706	3470	3121,2	837,319154	74,30
	100	2562	3505	3077	1525	3142	2762,2	769,064822	65,76
	1000	no realizado	931	934	594	1801	1065	515,963177	25,35
Peg-KPV	1	3893	3697	3918	2021	4340	3573,8	899,137198	85,08
	10	3918	3274	2846	1317,5	3909	3052,9	1070,58526	72,68
	100	3617	3067	2305	1110,5	3088	2637,5	973,283874	62,79
	1000	no realizado	971	1428	694,5	1586	1169,875	410,414907	27,85

- 5 Los datos indican un efecto inhibitor para KPV y peg-KPV (proporcionados por Invitrogen Life Technologies) así como α -MSH para la liberación de TNF- α inducida por LPS ("inflamación") cuando el proceso inflamatorio ya ha comenzado (preestimulación) o si los péptidos y el estímulo inflamatorio se proporcionan simultáneamente (incubación conjunta). Se usó la preincubación de LPS como modelo para imitar una situación urémica en pacientes, en los que ya están en curso procesos inflamatorios.

Ejemplo 2:

- 10 Estudios de sangre completa con sangre de pacientes urémicos incluyendo experimentos de esterilización térmica.

- Un primer objetivo de este experimento era someter a prueba si el péptido KPV antiinflamatorio de tres aminoácidos ("monopéptido" en versión no pegilada y pegilada) conservará su actividad en condiciones de esterilización por vapor a 125°C durante 15 min usadas en el procedimiento de producción de módulos de diálisis. Un segundo objetivo era estudiar el efecto antiinflamatorio de alfa-MSH y los péptidos en pacientes urémicos, que representan la situación clínica real.

- 15 Puesto que los péptidos tienden a perder actividad cuando se calientan, se diseñó el experimento para imitar el procedimiento de producción de diálisis con los parámetros conocidos.

- 20 Para realizar este experimento, se tomaron muestras de sangre completa de pacientes urémicos voluntarios (n = 10) y se estimularon posteriormente *ex vivo* con lipopolisacárido (LPS) con o sin alfa-MSH, KPV o KPV pegilado (no calentado y calentado) y se determinó la liberación de TNF- α y IL-6 mediante ELISA.

Material y métodos

- Se extrajeron 25 ml sangre de 10 pacientes urémicos (pacientes de diálisis tratados en el hospital en Constanza, Alemania) y se analizaron inmediatamente los valores en sangre. Se diluyó la sangre 1:10 con tampón PBS y se realizó cada condición de estimulación por triplicado y se incubó a 200 μ l en placas de 96 pocillos.

- 25 Se eligieron las siguientes condiciones:

- Sangre no estimulada

- Sangre estimulada con LPS 1 ng/ml solo (estimulación máxima de citocina proinflamatoria TNF- α).

- Sangre estimulada con LPS 1 ng/ml y 4 concentraciones diferentes de α -MSH.

- 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M

- Sangre estimulada con LPS 1 ng/ml y 5 concentraciones diferentes de

5 ◦ KPV (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M)

- KPV-peg (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M)

- Sangre estimulada con LPS 1 ng/ml y 5 concentraciones diferentes de

- KPV calentado (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M)

- KPV-peg calentado (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1000 μ M)

10 Se incubó la sangre durante 24 h, se centrifugó a 1700 rpm y se usaron los sobrenadantes séricos para la medición mediante ELISA de TNF- α e IL-6 según protocolos del fabricante.

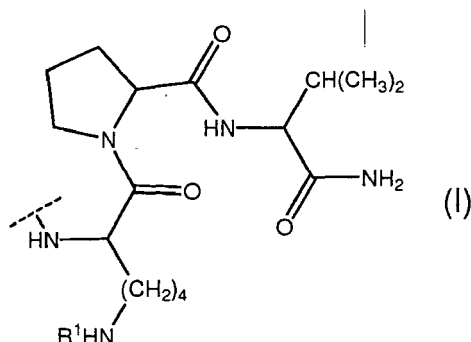
Resultados

15 El ELISA de TNF- α y IL-6 mostró que el tratamiento térmico no influyó en la actividad del péptido. La inhibición promedio para las concentraciones sometidas a prueba de KPV para TNF- α era de aproximadamente el 30% y para IL-6 de aproximadamente el 20%.

Los resultados se representan adicionalmente en las figuras 3, 4 y 5.

REIVINDICACIONES

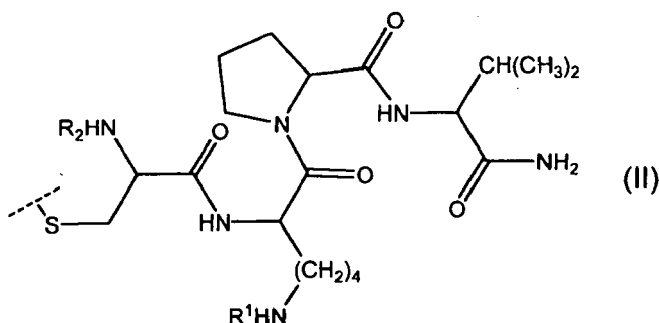
1. Construcción S-L-P que comprende una superficie S de un soporte sólido, un grupo de unión L y un péptido P, en la que el péptido P está inmovilizado sobre la superficie S a través del grupo de unión L, en la que el grupo de unión L comprende un resto poli(óxido de alquileo) y en la que el péptido P comprende un extremo C-terminal según la fórmula general (I)



en la que R^1 es -H o -C(=O)-alifato C_{1-8} , y

en la que la línea de puntos de la fórmula general (I) representa el resto de la construcción S-L-P.

2. Construcción según la reivindicación 1, en la que el péptido P comprende un extremo C-terminal según la fórmula general (II)



en la que R^1 y R^2 son independientemente entre sí -H o

-C(=O)-alifato C_{1-8} , y

en la que la línea de puntos de la fórmula general (II) representa el resto de la construcción S-L-P.

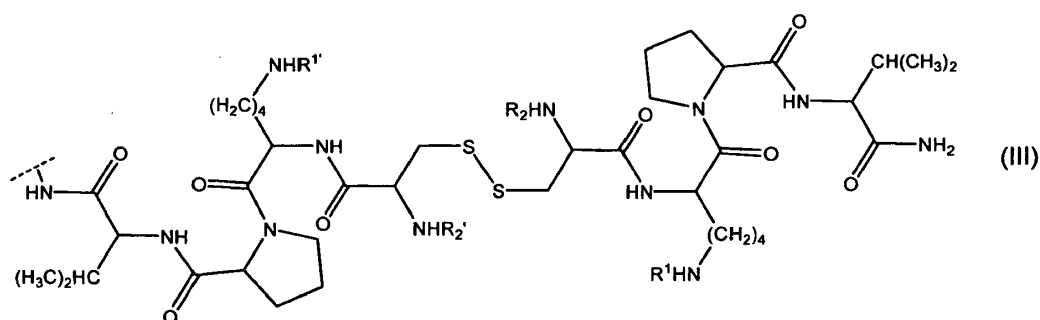
3. Construcción según la reivindicación 1 ó 2, en la que el péptido P consiste en residuos de α -aminoácido que tienen configuración L.

4. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido P incluye

- no más de 4 residuos de α -aminoácido unidos directamente entre sí a través de enlaces peptídicos o

- dos subsecuencias que incluyen cada una no más de 4 residuos de α -aminoácido unidos directamente entre sí a través de enlaces peptídicos, en la que dichas dos subsecuencias están unidas entre sí a través de un enlace no peptídico.

5. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el péptido P comprende un dímero según la fórmula general (III)



en la que R^1 , $R^{1'}$, R^2 y $R^{2'}$ son independientemente entre sí -H o

-C(=O)-alifato C_{1-8} , y

en la que la línea de puntos de la fórmula general (III) representa el resto de la construcción S-L-P.

- 5 6. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el grupo de unión L no incluye ningún residuo de α -aminoácido.
7. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la superficie S está adaptada para ponerse en contacto con un líquido corporal.
- 10 8. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el soporte sólido es un componente de un circuito extracorpóreo.
9. Procedimiento para la fabricación de una construcción S-L-P según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende la etapa de unir un péptido P según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 a una superficie S de un soporte sólido a través de un grupo de unión L.
- 15 10. Construcción según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en hemodiálisis, hemofiltración, plasmaféresis, aféresis, oxigenación por membrana extracorpórea o circulación sanguínea asistida.

Figura 1A

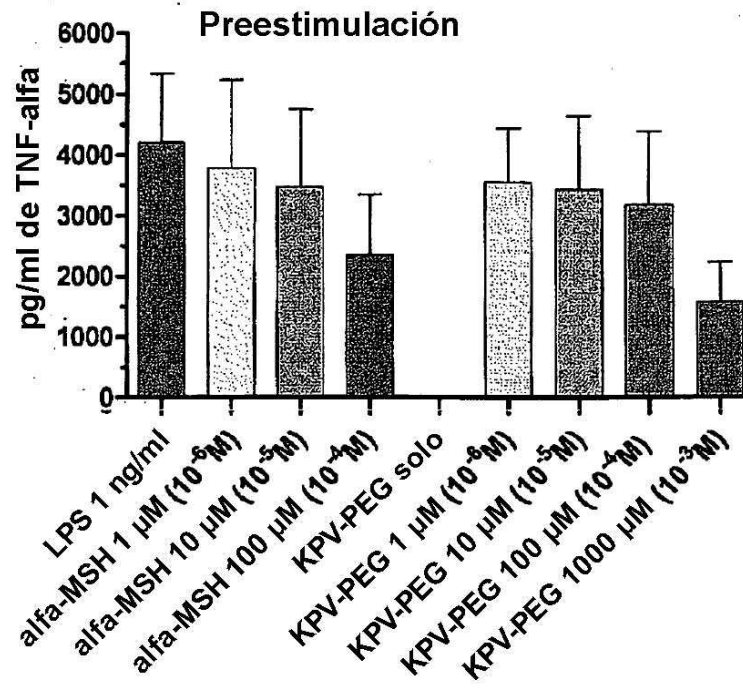


Figura 1B

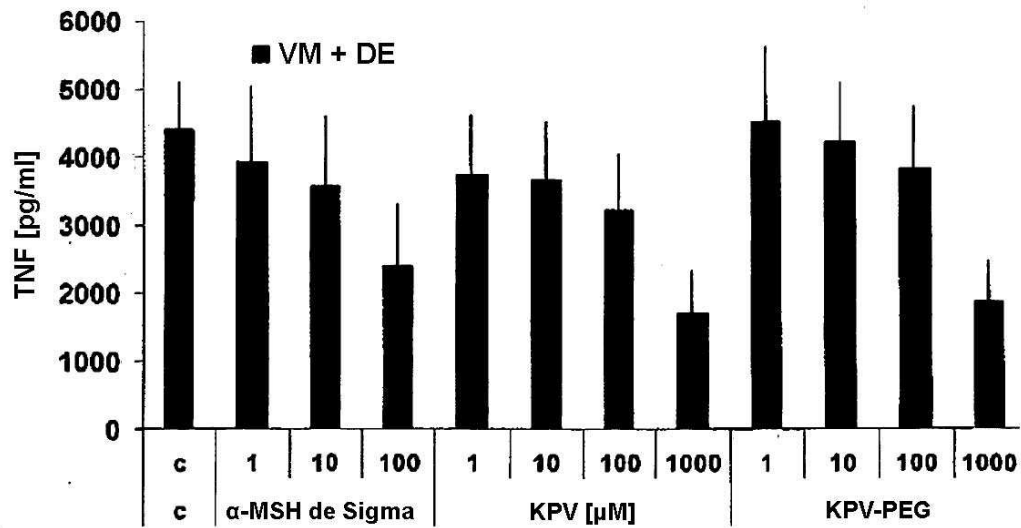


Figura 2A

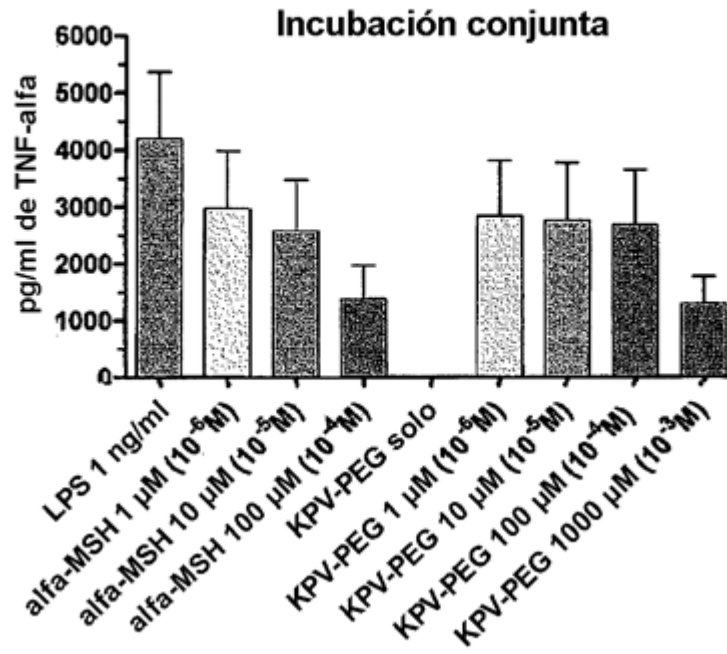
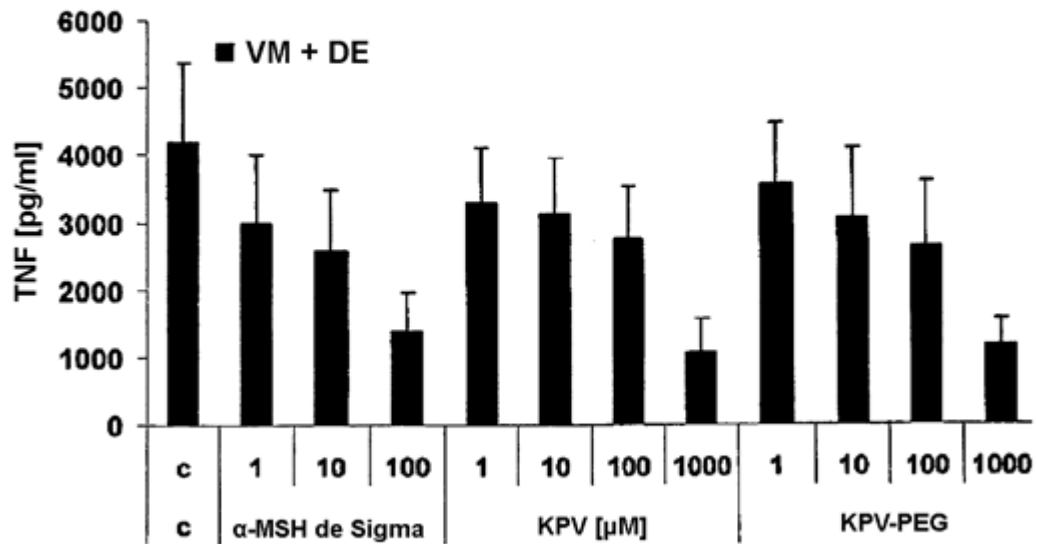
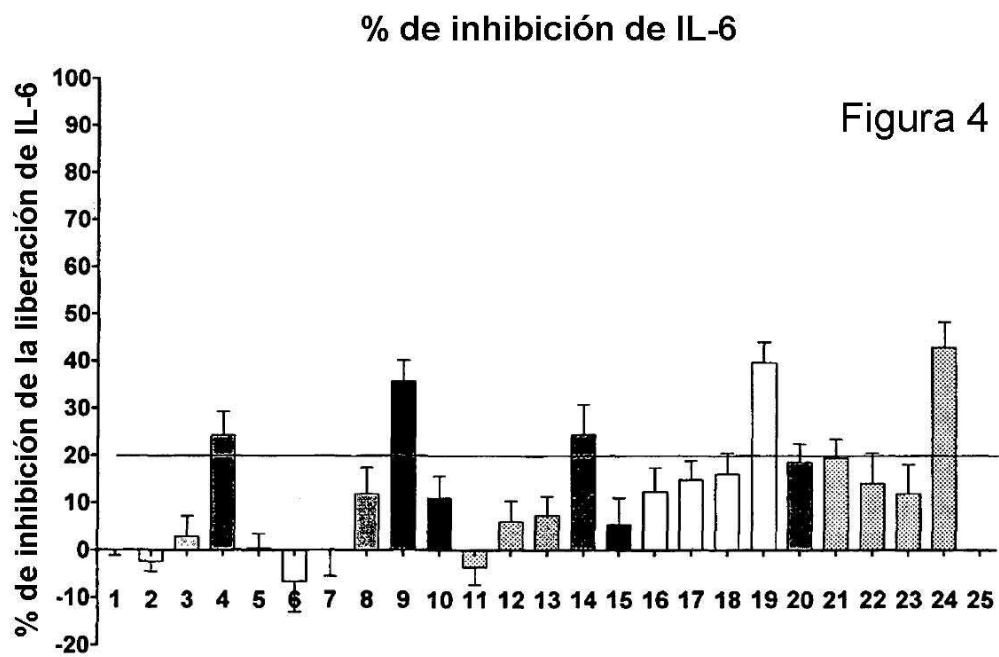
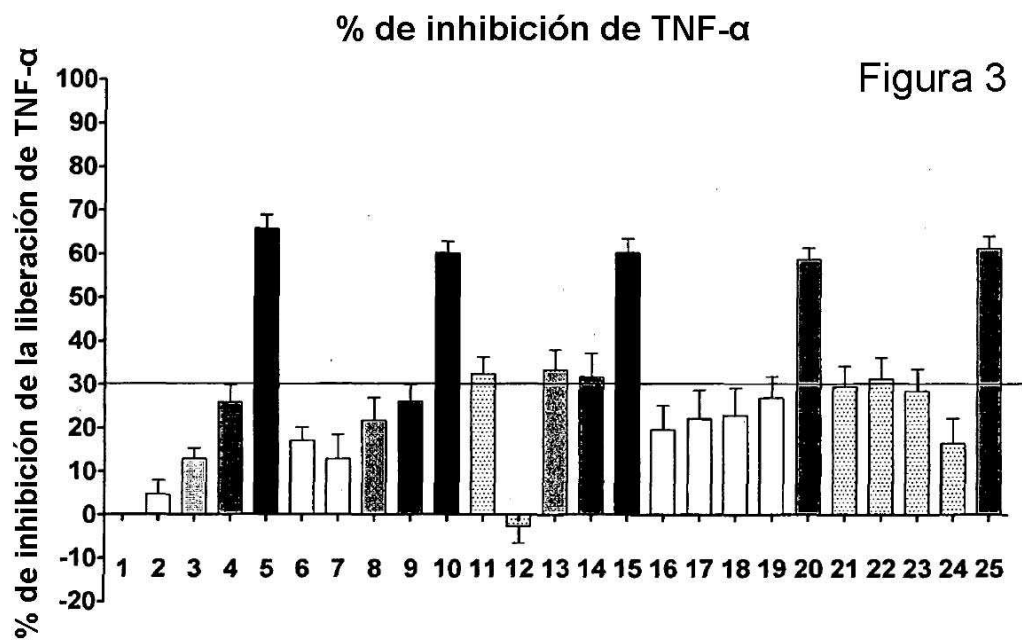


Figura 2B





Leyenda

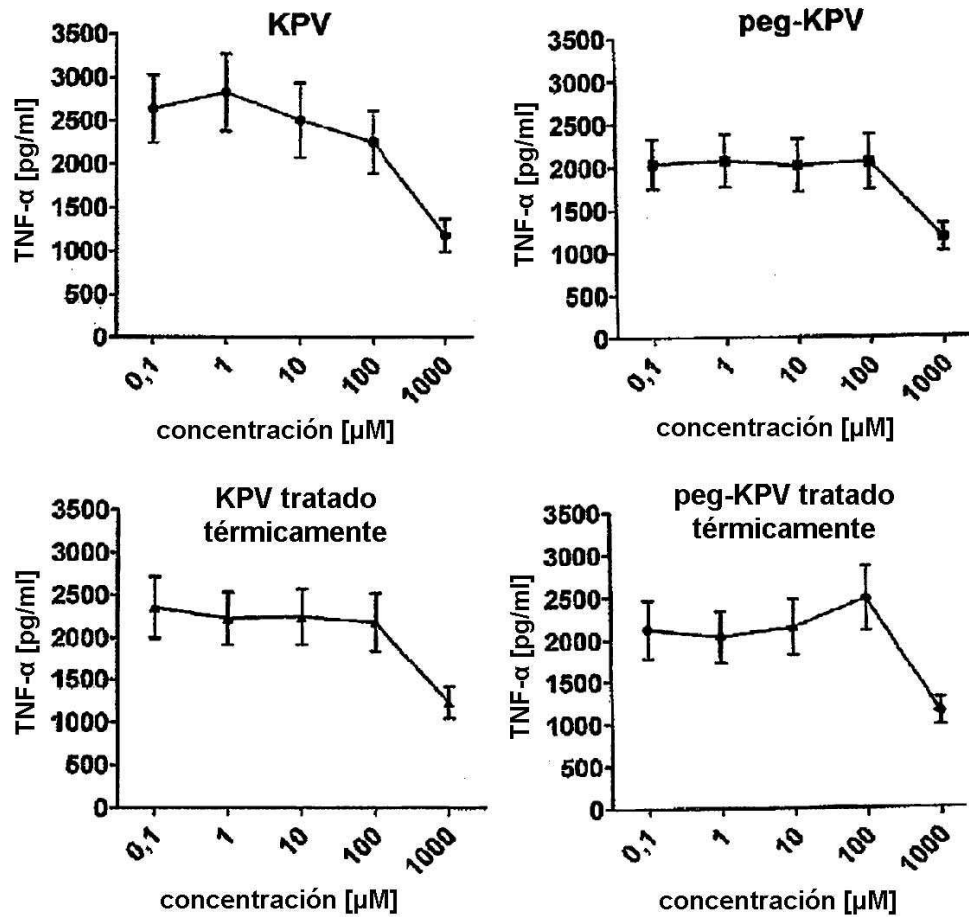
Columna Sustancia

- 1 LPS 1 ng/ml
- 2 α -MSH 0,1 mM
- 3 α -MSH 1 mM
- 4 α -MSH 10 mM
- 5 α -MSH 100 mM
- 6 KPV 0,1 mM
- 7 KPV 1 mM
- 8 KPV 10 mM
- 9 KPV 100 mM
- 10 KPV 1000 mM
- 11 KPV-PEG 0,1 mM
- 12 KPV-PEG 1 mM
- 13 KPV-PEG 10 mM
- 14 KPV-PEG 100 mM
- 15 KPV-PEG 1000 mM
- 16 KPV calentado 0,1 mM
- 17 KPV calentado 1 mM
- 18 KPV calentado 10 mM
- 19 KPV calentado 100 mM
- 20 KPV calentado 1000 mM
- 21 KPV-PEG calentado 0,1 mM
- 22 KPV-PEG calentado 1 mM
- 23 KPV-PEG calentado 10 mM
- 24 KPV-PEG calentado 100 mM
- 25 KPV-PEG calentado 1000 mM

Abreviaturas

LPS	lipopolisacárido
α -MSH	hormona estimulante de melanocitos alfa
KPV	extremo C -erminal del péptido MSH, terminación Lys-Pro-Val
KPV-PEG	KPV unido a polietilenglicol

Figura 5



Media $\pm$ EEM; n = 10 pacientes urémicos; tratamiento térmico = 15 min, 125°C