

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 518 493**

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 11002918 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.09.2014 EP 2508199**

54 Título: **Hormona estimulante de melanocitos para suprimir reacciones inflamatorias en la hemodiálisis**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
05.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**PASSLICK-DEETJEN, JUTTA;
FISLAGE, RAINER;
KUHN, ANJA y
STEPPAN, SONJA**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 518 493 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

Hormona estimulante de melanocitos para suprimir reacciones inflamatorias en la hemodiálisis

5 Se divulga una construcción S-L- α MSH que comprende una superficie S de un soporte sólido, un conector L y hormona estimulante de melanocitos α MSH, en la que la α MSH está inmovilizada sobre la superficie S a través del conector L y en la que el conector L comprende un resto de poli(óxido de alquileno). La invención se refiere además a un conjugado L- α MSH que comprende tal conector L y α MSH. La construcción S-L- α MSH es útil en el tratamiento por diálisis, particularmente para la prevención y/o la supresión de respuestas y procesos inflamatorios.

10 La diálisis es un método de depuración de la sangre de un individuo cuando los riñones no funcionan apropiadamente. La diálisis elimina la sal, los residuos y el agua sobrantes del cuerpo y ayuda a controlar la presión sanguínea.

15 Habitualmente se distinguen dos tipos de diálisis: hemodiálisis y diálisis peritoneal. En la hemodiálisis, un paciente se conecta a través de tubos a un riñón artificial. La sangre es bombeada fuera del cuerpo hasta el riñón artificial que filtra la sangre, y a continuación la sangre se devuelve al cuerpo. En la diálisis peritoneal, el revestimiento interior de la cavidad peritoneal del paciente se usa como un filtro natural. Los residuos se retiran por medio de un fluido, el dializado, que se introduce y se saca por lavado de la cavidad peritoneal cíclicamente.

20 En la hemodiálisis, un riñón artificial (hemodializador) se usa para retirar de la sangre residuo, productos químicos sobrantes y fluido en exceso. Para transferir sangre de un paciente de diálisis al riñón artificial, se requiere un acceso vascular. Un acceso común se realiza ligando una arteria a una vena bajo la piel y creando así una fistula. A continuación, la fistula se atraviesa, permitiendo el acceso a la sangre. Ocasionalmente, se realiza un acceso por medio de un catéter, que se inserta en una vena grande del cuello. Este tipo de acceso puede ser temporal, pero en muchos casos se puede usar para un tratamiento a largo plazo. Como con cualquier tratamiento de acceso vascular o catéter, el catéter crea una comunicación directa entre el ambiente interno aséptico del paciente y el exterior. Complicaciones comunes de esta comunicación son infecciones, inflamaciones y un bloqueo trombotico o infiltrante del acceso.

25 La inflamación representa una importante complicación médica asociada con la diálisis. De hecho, aunque los beneficios de la hemodiálisis y la diálisis peritoneal son numerosos, muchas de las complicaciones asociadas con cada una de ellas pueden ser letales. Cada técnica tiene sus propias complicaciones o similares, incluyendo, pero no limitadas a, fallo de ultrafiltración, aceptación, obesidad, depuración y escasa aceptación de fluidos.

30 La inflamación es un factor importante para la alta mortalidad en pacientes con neuropatía terminal (ESRD, por sus siglas en inglés). Se considera que la inflamación representa un papel principal en el daño arterial en pacientes de diálisis. Aunque los mecanismos precisos que conducen a este estado inflamatorio en la ESRD no están claros, una infección de grado bajo, una exposición repetida a filtros de diálisis y los productos de autooxidación se analizan como probables factores causales en estos pacientes (cfr. C. Zocallì et al., *Blood purification*, 2003, 21, 29-36; y P. Stenvinkel et al., *Semin. Dial.*, 2002, 15, 329-37).

35 Se demandan métodos que provoquen menos inflamación en pacientes de hemodiálisis.

α MSH (hormona estimulante de melanocitos) deriva de una hormona precursora, a saber propiomelanocortina (POMC). El procesamiento postraduccional de POMC da hormonas peptídicas tales como ACTH, α MSH, γ MSH y β -endorfina.

α MSH tiene múltiples efectos sobre el huésped.

40 El efecto estimulante de α MSH en células pigmentarias se conoce desde hace más de 50 años. Hallazgos más recientes indican que α MSH controla la toma de alimentos y las secreciones exocrinas, modula la fiebre (cfr. D. B. Richards et al., *Peptides* 1984, 5(4), 815-7) y las reacciones inflamatorias y tiene un efecto antimicrobiano (cfr., p. ej. A. Catania et al., *J Leukoc Biol.* 2000, 67(2), 233-9). α MSH induce la expresión de Fos en neuronas oxitocínicas supraópticas (N. Sabatier et al., *J. Neuroscience*, 2003, 23(32), 10351-8).

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

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.

WO 2004/004551 divulga una composición y un método para controlar la respuesta del huésped al trasplante y el

injerto de órganos y/o tejidos. α MSH protege al órgano y el tejido después del trasplante controlando factores dentro del donante, el huésped y del órgano o el tejido que se va a trasplantar.

5 Se sabe que las concentraciones de α MSH son elevadas en pacientes sometidos a hemodiálisis crónica. Se observan concentraciones de hasta 30 ng/l mientras que los pacientes sanos muestran concentraciones solamente de hasta 25 ng/l. La concentración de α MSH es elevada particularmente cuando se puede observar simultáneamente una concentración elevada de endotoxina. Posiblemente, la liberación de α MSH se induce mediante citocinas para limitar su efecto (cfr. L. Airaghi et al., *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15, 1212-6).

10 WO 03/094990 se refiere a oligo- y polisacáridos que contienen el elemento estructural sacárico N-acilglucosamina o N-acilgalactosamina, además de a su uso para producir superficies hemocompatibles y métodos para revestir superficies con dichos oligo- y polisacáridos, que constituyen las sustancias precursoras biosintéticas comunes de heparina, sulfatos de heparano y quitosano.

WO 2004/104019 divulga el uso de α MSH para el uso en la diálisis y en el tratamiento de la inflamación.

15 Kelly et al. divulga una construcción de S-L- α MSH para el uso en el tratamiento de la inflamación (Kelly et al., "Immobilized alpha-melanocyte stimulating hormone 10-13 (GKPV) inhibits tumor necrosis factor-alpha stimulated NF-kappaB activity", *PEPTIDES*, 27 (2006) 431-437).

Gatti et al. divulga el uso de α -MSH así como de KPV para el uso en la diálisis y en el tratamiento de la inflamación. (Gatti et al., "Inhibitory Effects of the Peptide (CKPV)2 on Endotoxin-Induced Host Reactions", *JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH*, 131 (2006) 209-214)

US 2010/143438 divulga una construcción de S-L- α MSH para el uso en el tratamiento de la inflamación.

20 WO 03/094990 se refiere al revestimiento de superficies hemocompatibles incluyendo dispositivos de diálisis.

WO 2010/129248 divulga una construcción de S-L- α MSH para el uso en el tratamiento de la inflamación.

Sin embargo, estas composiciones no son satisfactorias en todos los aspectos y hay una demanda de mejoras adicionales de la hemodiálisis.

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

Este objetivo se consigue mediante el contenido de las reivindicaciones de patente.

Se ha encontrado sorprendentemente que superficies que se modifican con α MSH son particularmente útiles en la hemodiálisis con respecto a la prevención y/o la supresión de la inflamación.

30 Para el propósito de esta invención, α MSH también se puede reemplazar por fracciones de α MSH. Las fracciones pueden ser péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos de al menos 3 aminoácidos que también está comprendida en α MSH. Un péptido preferido de este tipo tiene o comprende la secuencia de aminoácidos KPV.

35 Un primer aspecto de la invención se refiere a una construcción S-L- α MSH que comprende una superficie S de un soporte sólido, un conector L y hormona estimulante de melanocitos α MSH, en la que α MSH está inmovilizada a la superficie S a través del conector L, para el uso en un tratamiento de diálisis, preferiblemente hemodiálisis o diálisis peritoneal.

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

40 La superficie S del soporte sólido no está particularmente limitada, con tal de que sea capaz de la inmovilización de α MSH a través del conector L.

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

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

Para el propósito de la memoria descriptiva, la hemocompatibilidad se define preferiblemente según ISO 10993-4

que se refiere a pruebas relativas a los efectos de sangre que entra en contacto con el producto o de compuestos sobre la sangre o componentes de la sangre, directamente o indirectamente durante el uso normal.

La hemocompatibilidad se consigue preferiblemente proveyendo al soporte sólido de un revestimiento externo, p. ej., una capa hemocompatible. La capa hemocompatible se puede añadir directamente sobre la superficie de un soporte sólido preferiblemente no hemocompatible o depositar sobre otras capas bioestables y/o biodegradables. Capas bioestables y/o biodegradables y/o hemocompatibles adicionales pueden estar presentes sobre la capa hemocompatible.

Los materiales hemocompatibles son conocidos para el experto en la técnica. Preferiblemente, la superficie S del soporte sólido se hace hemocompatible entre otras cosas por la presencia de α MSH que está inmovilizada sobre la superficie S a través del conector L.

Se prefiere que al menos una capa bioestable esté presente bajo la capa hemocompatible. Además, la capa hemocompatible puede estar revestida totalmente y/o parcialmente con al menos una capa bioestable y/o biodegradable superpuesta más.

Ejemplos de sustancias biodegradables para la capa o las capas biodegradables incluyen polivalerolactonas, poli(ácido lactónico), poli-[ϵ]-decalactonas, poli(ácido glicólico), poliláctidos, poliglicólidos, copolímeros de los poliláctidos y poliglicólidos, poli-[ϵ]-caprolactona, poli(ácido hidroxibutanoico), polihidroxibutiratos, polihidroxicaprolactonas, polihidroxibutirato-co-valeratos, poli(1,4-dioxano-2,3-dionas), poli(1,3-dioxan-2-ona), poli-paradioxanonas, polianhídridos tales como poli(anhídridos maleicos), polihidroximetacrilatos, fibrina, policianoacrilatos, poli(dimetacrilatos de caprolactona), poli(ácido β -maleico), poli(butilacrilatos de caprolactona), polímeros de múltiples bloques tales como, p. ej., de oligocaprolactonadióles y oligodioxanonadióles, polímeros de múltiples bloques de poliéter-éster tales como, p. ej., PEG y poli(tereftalatos de butileno), polipivotalactonas, poli(trimetilcarbonatos de ácido glicólico), policaprolactona-glicólidos, poli(glutamato de γ -etilo), poli(iminocarbonato de DTH), poli(carbonato de DTE-co-DT), poli(iminocarbonato de bisfenol A), poliiminocarbonatos, poliortoésteres, poli(trimetilcarbonatos de 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 cadena principal, poliéter-ésteres tales como poli(óxido de etileno), poli(oxalatos de alqueno), poliortoésteres así como sus copolímeros, carrageninas, lípidos, fibrinógeno, almidón, colágeno, polímeros basados en proteínas, poliaminoácidos, poliaminoácidos sintéticos, zeína, zeína modificada, polihidroxialcanoatos, ácido actínico, ácido péptico, 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 arábiga, goma guar, gelatina, colágeno, colágeno-N-hidroxisuccinimida, lípidos, fosfolípidos, modificaciones y copolímeros y/o mezclas de las sustancias susodichas.

Ejemplos de sustancias bioestables para la capa o las capas bioestables incluyen poli(ácido acrílico) y poliácrilatos como poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de butilo), poliacrilamida, poliacrilonitrilo, poliamidas, polieteramidas, polietilenaamina, poliimididas, policarbonatos, policarboureтанos, polivinilcetonas, poli(halogenuros de vinilo), poli(halogenuros de vinilideno), poliviniléteres, poliisobutilenos, polivinilaromatos, polivinilésteres, 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, carboximetilquitosanos, poliarieteretercetonas, polieteretercetonas, poli(tereftalato de etileno), polivaleratos, carboximetilcelulosa, celulosa, rayón, triacetatos de rayón, nitratos de celulosa, acetatos de celulosa, hidroxietilcelulosa, butiratos de celulosa, acetato-butilatos de celulosa, copolímeros de acetato de etilvinilo, polisulfonas, resinas epoxídicas, resinas de ABS, gomas de EPDM, siliconas como polisiloxanos, polidimetilsiloxanos, polivinilhalógenos y copolímeros, éteres de celulosa, triacetatos de celulosa, quitosanos y copolímeros y/o mezclas de estas sustancias.

En una realización preferida, la superficie S contiene al menos un área con una concentración superficial de α MSH de al menos 1,0 nmol/cm², más preferiblemente al menos 2,0 nmol/cm², aún más preferiblemente al menos 5 nmol/cm², todavía más preferiblemente al menos 10 nmol/cm², lo más preferiblemente al menos 25 nmol/cm² y en particular al menos 50 nmol/cm². Preferiblemente, dicha área tiene un tamaño de al menos 1,0 cm².

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

En una realización preferida, la superficie S del soporte sólido es adecuada para el contacto a corto o largo plazo con sangre y productos sanguíneos. Ejemplos de soportes sólidos incluyen dispositivos médicos tales como

- prótesis, órganos, vasos, aortas, válvulas cardíacas, tubos, piezas de recambio de órganos, implantes, fibras, fibras huecas, endoprótesis vasculares, agujas huecas, jeringas, membranas, conservas, recipientes para sangre, placas valorimétricas, marcapasos, medios adsorbentes, medios cromatográficos, columnas cromatográficas, dializadores, piezas de conexión, sensores, válvulas, cámaras centrífugas, recuperadores, endoscopios, filtros, y cámaras de bombeo. Se prefieren particularmente los dializadores, especialmente sus componentes, particularmente membranas de diálisis.
- 5
- El soporte sólido puede estar compuesto de un material inorgánico y/u orgánico, un metal o polímeros. Los polímeros adecuados pueden ser termoplásticos y son conocidos por los expertos.
- El soporte sólido y la superficie S, respectivamente, pueden asumir cualquier conformación, p. ej. plana, convexa, cóncava y similares. Cuando el soporte sólido es una membrana de diálisis, puede ser, p. ej., fibrosa, similar a un tejido, una fibra hueca o una membrana plana.
- 10
- Conectores L que son adecuados para inmovilizar α MSH sobre una superficie S adecuada son conocidos por los expertos. A este respecto, se puede hacer referencia, p. ej., a G.T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Segunda Edición, Academic Press 2008; F. Zaragoza Dörwald, *Organic Synthesis on Solid Phase: Supports, Linkers, Reactions*, Wiley-VCH; 2 edición 2002; J. M. Guisan, *Immobilization Of Enzymes And Cells (Methods in Biotechnology)*, Humana Press; 2 edición 2006; J.A. Camarero, *Biopolymers*. 2008, 90(3), 450-8.
- 15
- La naturaleza química del conector L no está particularmente limitada. Conectores L típicos comprenden al menos un extremo distal que hace frente a α MSH y al menos un extremo proximal que hace frente a la superficie S.
- El conector L puede tener cualquier distancia de extremo a extremo desde el extremo distal hasta el extremo proximal que sea adecuada para inmovilizar α MSH sobre la superficie S del soporte sólido. Longitudes (medias) típicas están en el intervalo de unos pocos nanómetros a varios nanómetros o más.
- 20
- Preferiblemente, el conector L es una molécula orgánica. Puede contener una cadena carbono-carbono ininterrumpida entre el extremo distal y el extremo proximal. Preferiblemente, sin embargo, entre al menos algunos de los átomos de carbono de la cadena hay heteroátomos que preferiblemente se seleccionan independientemente de Si, N, S y O.
- 25
- Preferiblemente, el conector L es sustancialmente lineal. Preferiblemente, el conector L comprende un resto que está compuesto por unidades de repetición, como en un polímero u oligómero. Por ejemplo, cuando el conector L comprende un resto de polietilenglicol, las unidades de repetición son $-(O-CH_2CH_2)_x-$.
- El conector L se puede derivar de biomoléculas, tales como péptidos, o puede ser sintético, tal como polialquilenglicoles, p. ej., polietilenglicoles o polipropilenglicoles.
- 30
- El conector L puede estar compuesto por varios segmentos que difieren entre sí en la naturaleza química pero están conectados covalentemente entre sí. Por ejemplo, un primer segmento del conector L puede ser peptídico y un segundo segmento del conector L que está unido covalentemente a dicho primer segmento puede ser un polialquilenglicol o poli(óxido de alquileno).
- 35
- El conector L comprende un segmento o resto de poli(alquilenglicol) o poli(óxido de alquileno).
- En una realización preferida, el conector L no incluyen ningún residuo de α -aminoácido, es decir, el conector no es peptídico.
- En una realización preferida, el peso molecular total del conector L está dentro del intervalo de 500 g/mol a 2.000.000 g/mol, más preferiblemente de 750 g/mol a 1.000.000 g/mol, aún más preferiblemente de 1.000 g/mol a 500.000 g/mol, todavía más preferiblemente de 1.250 g/mol a 100.000 g/mol, lo más preferiblemente de 1.500 g/mol a 50.000 g/mol y en particular de 2.000 g/mol a 10.000 g/mol.
- 40
- En una realización preferida, la superficie S comprende grupos carboxilo libres (-COOH) que se activan mediante el uso de EDC u otros compuestos de activación. Posteriormente, esta superficie S activada preferiblemente se pone en contacto con un α MSH modificada con amino-PEG para dar el correspondiente enlace covalente.
- 45
- El conector L preferiblemente está unido covalentemente a la superficie S, p. ej. a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace amida, un enlace tioéter y similares. Se pueden conseguir inmovilizaciones quimiosselectivas, p. ej., mediante una conexión de un grupo amino a aldehído, una conexión de un grupo aminooxiacetilo a glioxililo, una conexión de un residuo de cisteína a tioéster, una conexión de un residuo de ciclopentadieno a benzoquinona, y similares.

5 Soportes sólidos que tienen en sus superficies S grupos funcionales reactivos que son capaces de reaccionar con un grupo funcional compatible en el extremo proximal del conector L están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los soportes sólidos pueden tener en sus superficies S grupos funcionales reactivos seleccionados del grupo que consiste en aminas, tioles, aldehídos, ácidos carboxílicos, grupos aminoxiacetilo, grupos glioxililo, grupos tioéster, grupos ciclopentadieno, benzoquinonas, trialcoxilanos y similares.

Métodos para introducir dichos grupos funcionales reactivos en las superficies S de los soportes sólidos también son conocidos por los expertos en la técnica.

10 Preferiblemente, el conector L y la superficie S del soporte sólido están conectados entre sí solamente mediante enlaces covalentes de modo que entre la α MSH y la superficie S haya una cadena continua de enlaces covalentes, cadena que puede ser lineal o ramificada.

15 También es posible que el conector L esté unido no covalentemente a la superficie S, p. ej. mediante interacción biotina-(estrept)avidina y similares. Bajo estas circunstancias el soporte sólido tiene en su superficie S, p. ej., moléculas de biotina que se ligan a la superficie S mediante métodos convencionales. El extremo proximal del conector L tiene a su vez un grupo (estrept)avidina compatible de modo que se pueda formar un complejo molecular inmovilizando de ese modo el conector a la superficie S. Un experto sabe que la localización de la biotina y la (estrept)avidina en la superficie S y el conector L se pueden intercambiar. El marcaje con biotina se puede conseguir fácilmente, p. ej., mediante pegilación de biotina.

20 Preferiblemente, el conector L está unido covalentemente a α MSH, p. ej. a través de un enlace éster, un enlace éter, un enlace amida, un enlace tioéster y similares. Tal conexión se puede conseguir, p. ej., mediante una conexión de un grupo amino a aldehído, una conexión de un residuo de cisteína a tioéster, una conexión de amida y similares.

Conectores L que tienen en sus extremos distales grupos funcionales reactivos que son capaces de reaccionar con un grupo funcional compatible en α MSH están disponibles comercialmente. Por ejemplo, los conectores L pueden tener en sus extremos distales grupos funcionales reactivos seleccionados del grupo que consiste en aminas, tioles, alcoholes, aldehídos, ácidos carboxílicos, grupos aminoxiacetilo, grupos glioxililo, grupos tioéster y similares.

25 También es posible que el conector L esté unido no covalentemente a α MSH, p. ej. mediante interacción biotina-(estrept)avidina y similares. Bajo estas circunstancias, el conector L tiene en su extremo distal, p. ej., moléculas de biotina que se ligan al conector L mediante métodos convencionales. A su vez, la α MSH tiene un grupo (estrept)avidina compatible de modo que se puede formar un complejo molecular que ligue de ese modo la α MSH al extremo distal del conector L. Un experto sabe que la localización de la biotina y la (estrept)avidina en α MSH y el conector L se pueden intercambiar.

30 Preferiblemente, cada conector L tiene una molécula de α MSH. Sin embargo, también es posible que más de una molécula de α MSH esté conectada a un solo conector L. Esto se puede conseguir, por ejemplo, por medio de conectores L ramificados que tienen un extremo proximal ligado a la superficie S del soporte sólido y más de un extremo distal, p. ej. 2, 3 o 4 extremos distales, conectados cada uno a una molécula de α MSH.

35 En una realización preferida, la construcción S-L- α MSH según la invención comprende una subestructura -L- α MSH según la fórmula general (I)



en la que

40 Q es un enlace o un grupo funcional seleccionado de -O-, -NH-, -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 donde R' es alquilo C₁₋₆ o -O-alquilo(C₁₋₆);

n es un número entero de 0 a 250, preferiblemente de 1 a 25, más preferiblemente de 2 a 10; y

45 m es un número entero de 0 a 12, preferiblemente 1, 2 o 3.

Un aspecto adicional descrito en la presente se refiere a un conjugado L- α MSH que comprende un conector L como el definido anteriormente unido covalentemente a α MSH.

El conector L comprende un resto de polialquilenglicol, de forma particularmente preferida un resto de polietilenglicol (peg), de modo que el conjugado L- α MSH preferiblemente se pueda considerar como α -MSH que está pegilada mediante el resto polietilenglicol del conector L.

El conjugado L- α MSH según la invención puede tener una estructura según la fórmula general (II)



en la que

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

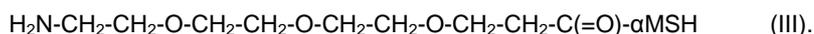
K es un enlace o un grupo funcional seleccionado de alquileo -C₁₋₈-, -NH-, -O-, -S-, -C(=O)- o -C(=O)O-;

10 n es un número entero de 0 a 250; y

m es un número entero de 0 a 12;

Para el propósito de la memoria descriptiva, grupos funcionales bivalentes que tienen dos posibilidades de incorporarse en una fórmula general en dos direcciones diferentes, p. ej. -NH-C(=O)-, se pueden incorporar en ambas direcciones alternativamente.

15 Se prefiere que Q sea -C(=O)-, m sea 2, n sea 3 y K sea -NH-, de modo que el conjugado L-P tenga la siguiente estructura (III)



20 El conjugado L- α MSH según la invención se puede emplear como un producto intermedio en la preparación de la construcción S-L- α MSH según la invención ligando el conjugado L- α MSH a la superficie S del soporte sólido mediante métodos apropiados.

También se describe un procedimiento para la fabricación de la construcción S-L- α MSH que comprende la etapa de conectar α MSH según se define anteriormente a una superficie S de un soporte sólido según se define anteriormente a través de un conector L según se define anteriormente.

25 En una realización preferida, el procedimiento comprende la etapa de conectar un conjugado L- α MSH según se define anteriormente a una superficie S de un soporte sólido según se define anteriormente.

30 En el procedimiento, el extremo proximal del conector L tiene un grupo funcional que está adaptado para la inmovilización covalente o no covalente del conector L en la superficie S. Para ese propósito, la superficie S típicamente tiene un grupo funcional que es compatible con el grupo funcional en el extremo proximal del conector L de modo que se pueda conseguir una conexión estable, opcionalmente después de la activación química de uno o ambos de los grupos funcionales.

Grupos funcionales y métodos de activación adecuados son conocidos por los expertos y se han descrito anteriormente en relación con el conector L y la superficie S, respectivamente.

La construcción S-L- α MSH es útil para diálisis tal como hemodiálisis y diálisis peritoneal, hemofiltración, plasmaféresis, aféresis, oxigenación extracorpórea con membrana o circulación sanguínea asistida.

35 Preferiblemente, se usa para prevenir y/o suprimir la inflamación, preferiblemente en pacientes en el transcurso de diálisis, hemofiltración, plasmaféresis, aféresis, oxigenación extracorpórea con membrana o circulación sanguínea asistida, preferiblemente en pacientes que sufren ESRD.

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención pero no se debe considerar que limiten su alcance.

Ejemplo 1:

Estimulación ex vivo de células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC, por sus siglas en inglés)

PBMC procedentes de voluntarios varones sanos (n=5) se aislaron y se estimularon como se indica posteriormente para imitar un entorno urémico e inflamatorio comparable al de los pacientes (preincubación con LPS durante 3 horas)

Material y Métodos

Para la estimulación de las PBMC se eligieron las siguientes concentraciones:

- LPS 1 ng/ml solo
- αMSH
 - 1 μM; 10 μM; 100 μM
- Peg-KPV (tripéptido pegilado)
 - 1 μM; 10 μM; 100 μM; 1.000 μM

El procedimiento de estimulación era como de describe posteriormente:

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

Todas las células se incubaron durante 24 h y se centrifugaron a 1.700 rpm y los sobrenadantes se usaron para la medida de TNF-α por ELISA según los protocolos del fabricante.

Resultados

Los resultados de la preestimulación se resumen en la siguiente tabla y se representan adicionalmente en las Figuras 1A y 1B:

TNF-α	Preincubación con LPS 3 h								
		Donante 2	Donante 3	Donante 4	Donante 5	Donante 6	MV+SD	SD	%
c	c	4808	4690	4400	3157	4897	4390,4	714,521028	100,00
αMSH 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 [μM]	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	1816	1494	1054	2482	1711,5	601,166366	38,98

		realizado							
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

Los resultados de la coincubación se resumen 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	MV+SD	SD	%
C	C	4463	5268	4749	2207	4316	4200,6	1172,25181	100,00
α MSH 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
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 ("inflamación") inducida por LPS cuando ya ha comenzado el proceso inflamatorio (preestimulación) o si los péptidos y el estímulo inflamatorio se dan simultáneamente (coincubación). La preincubación de LPS se usó como un modelo para imitar una situación urémica en pacientes, en la que ya están en marcha procesos inflamatorios.

Ejemplo 2:

Estudios en sangre entera con sangre procedente de pacientes urémicos incluyendo experimentos de esterilización térmica

- 10 Un primer objetivo de este experimento era probar si el péptido antiinflamatorio de tres aminoácidos KPV ("monopéptido" en versión no pegilada y pegilada) retendrá su actividad bajo condiciones de esterilización con vapor de agua 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 α 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, el experimento estaba diseñado para imitar el procedimiento de producción de diálisis con los parámetros conocidos.

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

20 **Material y Métodos**

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

Se eligieron las siguientes condiciones:

- 25
- Sangre no estimulada
 - Sangre estimulada con 1 ng/ml de LPS solo (estimulación máxima de la citocina proinflamatoria TNF- α).
 - Sangre estimulada con 1 ng/ml de LPS y 4 concentraciones diferentes de α -MSH
 - 0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M
 - Sangre estimulada con 1 ng/ml de LPS y 5 concentraciones diferentes de
 - KPV (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1.000 μ M)
 - KPV-peg (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1.000 μ M)
- 30

- Sangre estimulada con 1 ng/ml de LPS y 5 concentraciones diferentes de
 - KPV calentado (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1.000 μ M)
 - KPV-peg calentado (0,1 μ M; 1 μ M; 10 μ M; 100 μ M; 1.000 μ M)

5 La sangre se incubó durante 24 h, se centrifugó a 1.700 rpm y los sobrenadantes del suero se usaron para la medida por ELISA de TNF- α e IL-6 según los protocolos del fabricante.

Resultados

El ELISA de TNF- α e IL-6 mostraba que el tratamiento térmico no influía en la actividad del péptido. La inhibición media para las concentraciones probadas de KPV para TNF- α era alrededor de 30% y para IL-6 alrededor de 20%.

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

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una construcción S-L- α MSH que comprende una superficie S de un soporte sólido, un conector L y hormona estimulante de melanocitos α MSH, en la que α MSH está inmovilizada sobre la superficie S a través del conector L y en la que el conector L comprende un resto de poli(óxido de alquileno) para el uso en el tratamiento por diálisis, preferiblemente el tratamiento por hemodiálisis.
2. La construcción para el uso según la reivindicación 1, en la que el conector L no incluye ningún residuo de aminoácido.
3. La construcción para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la superficie S está adaptada para ponerse en contacto con un fluido corporal.
- 10 4. La construcción para el uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el soporte sólido es un componente de un circuito extracorpóreo.

Figura 2A
Coincubación

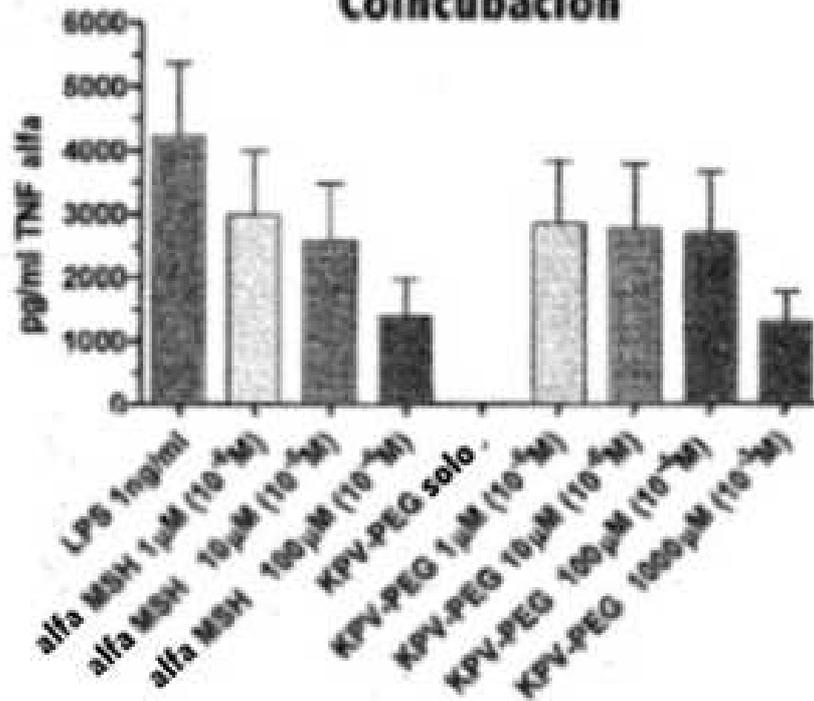
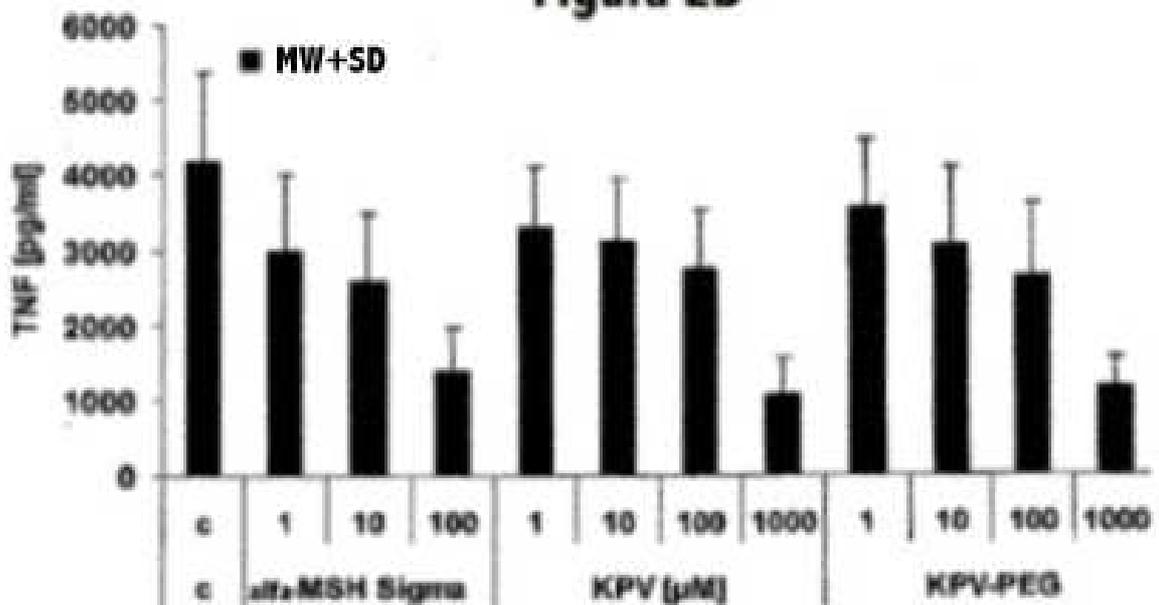
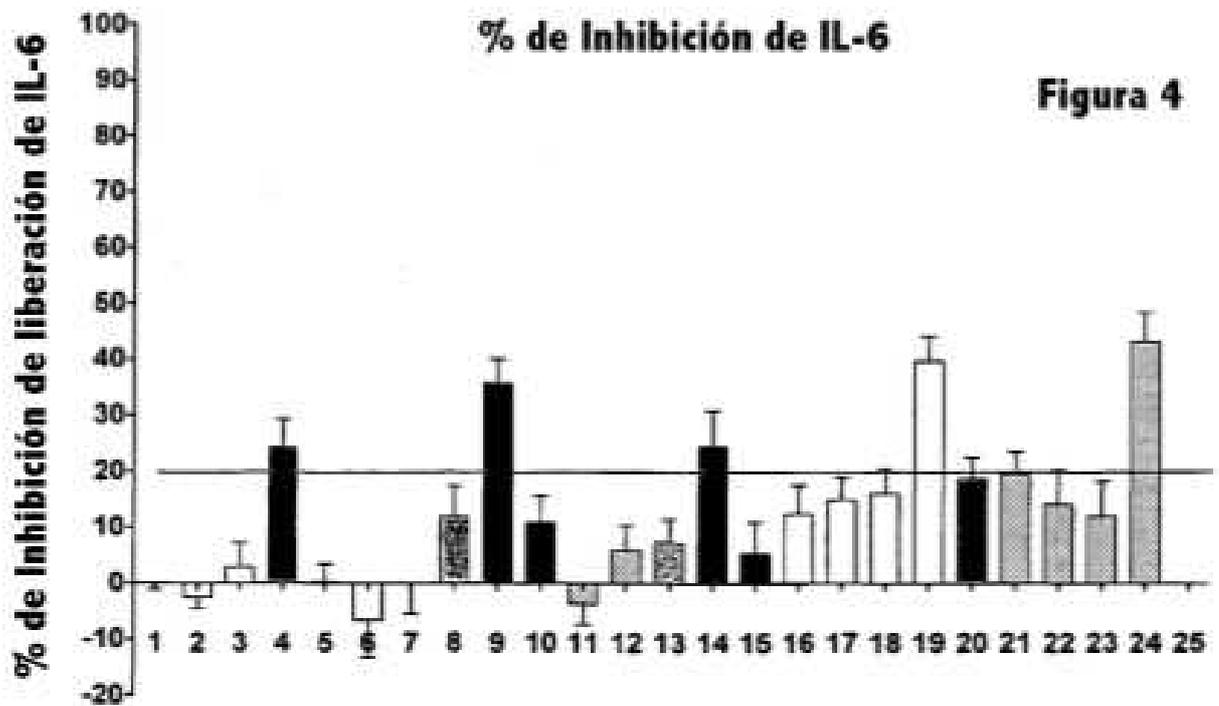
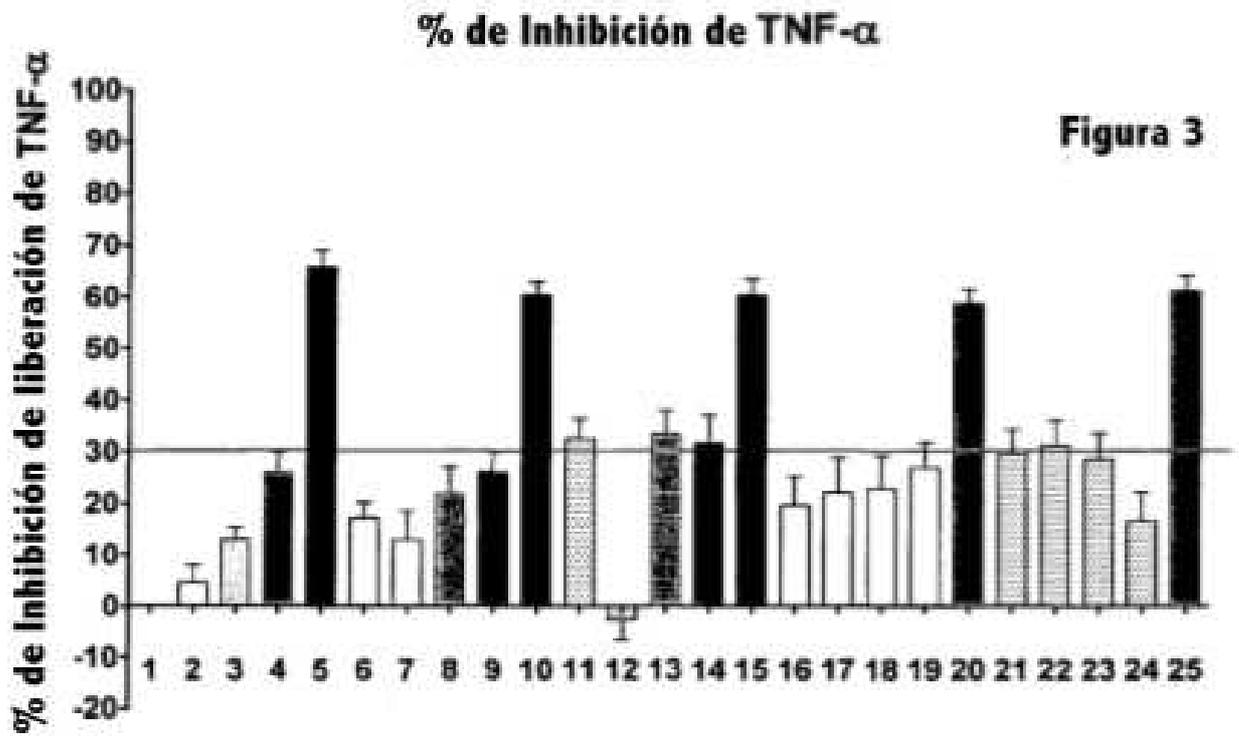


Figura 2B





Leyenda

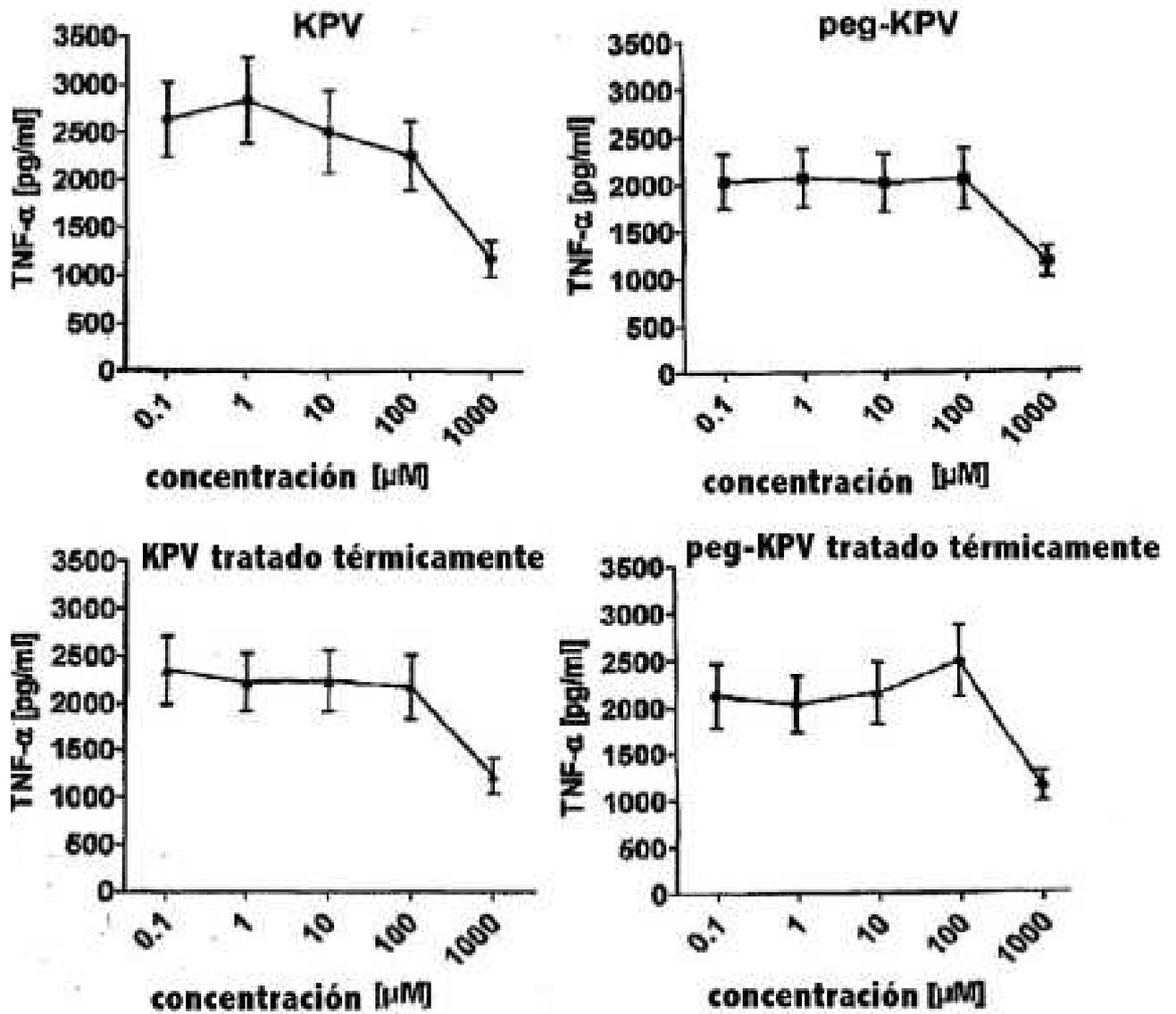
Sustancia de la Columna

- 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 1.000 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 1.000 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 1.000 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 1.000 mM

Abreviaturas

LPS	lipopolisacárido
α -MSH	hormona estimulante de melanocitos α
KPV	extremo c del péptido de MHS, que termina en Lys-Pro-Val
KPV-PEG	KPV ligado a polietilenglicol

Figura 5



media +/- SEM; n = 10 pacientes urémicos; tratamiento térmico = 15 min. 125°C