

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 542 227**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**C07K 7/64** (2006.01)

**C07K 14/525** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.06.2010 E 10166637 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.04.2015 EP 2397151**

54 Título: **Tratamiento de complicaciones vasculares de diabetes**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**03.08.2015**

73 Titular/es:

**APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG  
GMBH (100.0%)  
Mariahilferstrasse 136  
1050 Wien, AT**

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD y  
LUCAS, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 542 227 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

Tratamiento de complicaciones vasculares de diabetes

La presente invención se refiere a procedimientos para la prevención y el tratamiento de complicaciones vasculares de diabetes.

5 La diabetes mellitus es una enfermedad metabólica común afectando en todo el mundo a aproximadamente 150 millones de personas en 2000 y que se ha predicho que aumentará a 220 millones en 2010. La diabetes y las complicaciones asociadas a la misma se han convertido en un problema de salud pública de considerable magnitud. Las enfermedades cardiovasculares provocan la mayor parte del exceso de morbilidad en diabetes mellitus. Los adultos con diabetes tienen un riesgo aumentado de 2 a 4 veces de eventos cardiovasculares con respecto a los  
10 que no tienen diabetes. Las enfermedades cardiovasculares constituyen hasta el 80 % del exceso de mortalidad prematura en pacientes diabéticos. Debido a la elevada morbilidad prematura asociada a esta enfermedad, la prevención de estas complicaciones es un asunto clave.

En diabetes, la disfunción del endotelio vascular se considera un factor importante en la patogénesis de micro- y macroangiopatía diabética. Hay tres fuentes principales que contribuyen a la disfunción endotelial en diabetes: i) la hiperglucemia y sus secuelas bioquímicas inmediatas alteran directamente la función endotelial; ii) glucosa alta, que influye en la célula endotelial operando indirectamente mediante la síntesis de factores de crecimiento y agentes vasoactivos en otras células y altera la permeabilidad de la monocapa endotelial; iii) los componentes del síndrome metabólico que pueden afectar endotelialmente (Schalkwijk y col., Clin. Sci. 109 (2005), 143-159).

Woodman y col. (Life Sciences 82 (2008): 847-854) divulga un péptido natriurético atrial (ANP) para prevenir la disfunción endotelial inducida por diabetes. Según este estudio, el ANP mejora el estrés oxidativo vascular con respecto a la función endotelial independiente de cualquier efecto sobre niveles de glucosa en plasma, en un modelo de rata.

Es un objeto de la presente invención proporcionar medios para reducir el impacto patológico de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.

25 En consecuencia, la presente invención proporciona un péptido que consiste en 7-17 aminoácidos y que incluye el hexámero TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E adyacente, en el que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, en la que el péptido no muestra actividad inflamatoria específica de TNF (Hribar y col., Eur. J. Immunol. 1999; Elia y col., AJRCCM 2003; véase también la sección de ejemplos) y es cíclico, para su uso en el tratamiento y la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.

30 X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> se eligen preferentemente de los 20 aminoácidos estándar naturales de la serie básica de aminoácidos para la síntesis de proteínas naturales; incluso más preferentemente X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> se eligen de los aminoácidos naturales con cadena lateral hidrófoba (Ala, Ile, Leu, Met, Val, Pro y Gly). Son específicamente preferentemente (independientemente uno de otro) X<sub>1</sub> = Pro; X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> = Gly, Ala, Val, Leu o Ile; siendo preferentemente X<sub>2</sub>X<sub>3</sub> un dipéptido seleccionado de Gly-Ala, Gly-Val, Ala-Gly or Ala-Val.

35 Preferentemente, el péptido para su uso según la presente invención consiste en 7-17 aminoácidos y contiene el hexámero TPEGAE (SEC ID N°: 4), en la que el péptido es cíclico y no tiene ninguna actividad de unión al receptor de TNF.

Una realización particularmente preferente de la presente invención se refiere a un péptido cíclico que consiste en una secuencia de aminoácidos consecutivos seleccionados del grupo

40 - QRETPEGAEAKPWY (SEC ID N°: 5)  
- PKDTPEGAEALKPWY (SEC ID N°: 6)  
- CGQRETPEGAEAKPWYC (SEC ID N°: 1) y  
- CGPKDTPEGAEALKPWYC (SEC ID N°: 7)

45 y fragmentos de al menos siete aminoácidos que contienen el hexámero TPEGAE, para su uso en el tratamiento y la prevención de complicaciones cardiovasculares en pacientes con diabetes, en la que el péptido no muestra ninguna actividad de unión al receptor de TNF.

Los péptidos para su uso según la presente invención se conocen, por ejemplo de la patente europea EP 1 264 599 B1 para su uso en el tratamiento de edema pulmonar.

50 Sorprendentemente, estos péptidos han resultado ser específicamente beneficiosos para el tratamiento y la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes. La presente invención se refiere, por lo tanto, al uso de estos péptidos para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento y la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.

- El tipo de diabetes que se va a tratar o a prevenir según la presente invención puede ser cualquier clase de diabetes común, preferentemente diabetes de tipo 1 y diabetes de tipo 2, diabetes gestacional, diabetes esteroidea (inducida por dosis elevadas de glucocorticoides) y diversas formas de diabetes monogénica; no obstante, el tipo I y el tipo II son las enfermedades diana preferentes para la presente invención, especialmente la diabetes de tipo II. Se divulga un procedimiento para el tratamiento y la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes en el que se administra una cantidad eficaz de un péptido para su uso según la presente invención (o una mezcla de dichos péptidos) a un paciente con diabetes que tiene, o está en riesgo de desarrollar, una complicación vascular tal como se describe en el presente documento.
- La diabetes se caracteriza por una hiperglucemia recurrente o persistente y se diagnostica mediante demostración de uno cualquiera de los puntos siguientes:
- Nivel de glucosa en sangre en ayunas de, o superior a, 7,0 mmol/l (126 mg/dl (según la definición actual (OMS), dos mediciones de glucosa en ayunas superiores a 126 mg/dl (7,0 mmol/l) se considera diagnóstico de diabetes mellitus)
  - Glucosa en plasma de, o superior a, 11,1 mmol/l (200 mg/dl) dos horas después de una carga de glucosa por vía oral de 75 g como en un ensayo de tolerancia a la glucosa
  - Síntomas de hiperglucemia y glucosa en plasma casual de, o superior a, 11,1 mmol/l (200 mg/dl)
  - Glucohemoglobina (hemoglobina A1C) de, o superior a, 6,5 (Este criterio se recomendó por la Asociación Estadounidense de la Diabetes en 2010; debe ser aún adoptado por la OMS)
- Se considera que los pacientes con niveles de glucosa en ayunas de 100 a 125 mg/dl (5,6 a 6,9 mmol/l), tienen glucosa en ayunas alterada. Se considera que los pacientes con glucosa en plasma de, o superior a, 140 mg/dl (7,8 mmol/l), pero no superior a 200 mg/dl (11,1 mmol/l), dos horas después de una carga de glucosa por vía oral de 75 g, tienen tolerancia a la glucosa alterada. De estos dos estados prediabéticos, el último, en particular, es un factor principal de riesgo de progresión a una verdadera diabetes mellitus, así como de enfermedad cardiovascular (como una complicación vascular principal en pacientes con diabetes).
- Las complicaciones vasculares en pacientes con diabetes pueden estar provocadas por micro- y macroangiopatía. La microangiopatía retinal y la renal causan retinopatía y nefropatía diabética, respectivamente, y la microangiopatía de los vasos de los nervios es importante en la patogénesis de neuropatía. La macroangiopatía en diabetes consiste principalmente en una forma acelerada de aterosclerosis y afecta a las arterias coronaria, carótida y periférica, aumentando de este modo el riesgo de infarto de miocardio, apoplejía y enfermedad del pie diabético. Ensayo clínicos extensos sobre diabetes, tanto de tipo I como de tipo II, han demostrado que la hiperglucemia tiene un papel importante en la patogénesis de complicaciones microvasculares, tales como hiperpermeabilidad cardiaca microvascular. La hipertensión, el tabaquismo, la hipercolesterolemia, la dislipidemia, la obesidad y la hiperhomocisteinemia son causas principales adicionales de microangiopatía.
- El riesgo de macroangiopatía no parece estar muy relacionado con la hiperglucemia, pero está relacionado con factores de riesgo generales de aterotrombosis, tales como la edad, el tabaquismo, la hipertensión, la hipercolesterolemia, la lipidemia, la obesidad y la hiperhomocisteinemia. Todos los factores mencionados anteriormente crean un estado de daño constante y progresivo a la pared vascular, manifestado por un proceso inflamatorio de grado bajo y disfunción endotelial. Como ya se ha indicado anteriormente (Schalkwijk y col., 2005), la disfunción del endotelio vascular se considera un factor importante en la patogénesis de micro- y macroangiopatía. Los parámetros implicados en complicaciones vasculares durante la diabetes son una disfunción de la capacidad de vasorelajación y una hiperpermeabilidad cardiaca.
- La presente invención es, por lo tanto, específicamente adecuada para la prevención o el tratamiento de micro- y macroangiopatía, infarto de miocardio, hiperpermeabilidad cardiaca microvascular, apoplejía, neuropatía, retinopatía, nefropatía o enfermedad del pie diabético en pacientes con diabetes.
- Con la presente invención pueden tratarse o prevenirse las complicaciones vasculares de pacientes con diabetes. Ya que la diabetes es actualmente una enfermedad que, finalmente, no puede curarse, debe entenderse que el "tratamiento" según la presente invención incluye proporcionar una mejora de las complicaciones vasculares de pacientes con diabetes en comparación con la progresión habitual de estas complicaciones. De forma similar, la "prevención" según la presente invención también incluye que las complicaciones vasculares de pacientes con diabetes aparezcan más tarde en el estado patológico mediante lo proporcionado por la presente invención en comparación con la aparición habitual de estas complicaciones en pacientes con diabetes.
- Un péptido particularmente preferente para su uso según la presente invención consiste en la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y se cicla a través de los residuos de C (en la posición 1 y 17).
- La ciclación según la presente invención puede obtenerse mediante ciclación directa intramolecular de grupos funcionales de residuos de aminoácidos, preferentemente a través del enlace C-C (a través de un enlace disulfuro entre los dos residuos de C). El péptido también puede acoplarse (por ejemplo, a través de dos cisteínas) a una

sustancia vehículo. Preferentemente, los péptidos para su uso según la presente invención muestran, por lo tanto, residuos de cisteína al comienzo y al final de la molécula. Pueden usarse otros grupos funcionales capaces de ciclar el péptido, por ejemplo mediante un grupo amino o alcohol de un residuo de aminoácido, lo que produce un cierre de anillo de amida o éster (este puede incluir, por ejemplo, los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico con serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina o lisina, que pueden ciclarse preferentemente intramolecularmente).  
 5 Otros péptidos de la invención preferentes para su uso son, por lo tanto, por ejemplo, CGQKETPEGAEAKPWYC (SEC ID N°: 8), CGQRETPEGAEARPWYC (SEC ID N°: 9), CGQRETPEGAEAKPC (SEC ID N°: 10), CQRETPEGAEAKPWYC (SEC ID N°: 11) o CGQRETPEGAEAK-FWYC (SEC ID N°: 12).

Vehículos adecuados son todas las sustancias vehículo farmacéuticas usadas comúnmente que presentan grupos de unión adecuados para los péptidos para su uso según la presente invención, por ejemplo vehículos que reaccionan con grupos SH de las cisteínas para entrar en un enlace covalente. Otros vehículos adecuados comprenden grupos bifuncionales adyacentes (por ejemplo, un grupo ácido en la vecindad de un grupo amino o alcohol). En este contexto es importante indicar que "ciclación" según la presente invención incluye tanto la ciclación intramolecular como la implicación de un vehículo (del que el péptido unido sobresale (en el que el extremo N y el extremo C del péptido están unidos al vehículo formando un bucle sobre el vehículo)). En ambas realizaciones, el péptido cíclico muestra una estructura espacial cíclica y está, en consecuencia, estabilizado. En algunas realizaciones, la ciclación intramolecular es preferente, especialmente si la carencia de una molécula vehículo es ventajosa debido a razones de solubilidad o debido a razones de peso molecular o tamaño molecular.

Según otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene el péptido según la presente invención (o una mezcla de péptidos según la presente invención) y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.

La expresión "composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición o preparación que contiene un péptido, tal como se ha definido anteriormente, que mejora, cura o previene las afecciones descritas en el presente documento. En particular, la expresión "una composición farmacéutica" se refiere a una composición que comprende un péptido para su uso según la presente invención y un vehículo o excipiente (ambos términos se usan de forma intercambiable) farmacéuticamente aceptable. Los vehículos o excipientes adecuados son conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, tampones, solución de Hank, compuestos formadores de vesícula (por ejemplo, lípidos), aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5 % en solución salina, sustancias que aumentan la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos en el paciente que sean perjudiciales para el paciente. Ejemplos son proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácido glicólico), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos que sean bien tolerables. Como se ha descrito anteriormente, los péptidos para su uso según la presente invención pueden ciclarse a dicho vehículo mediante enlace covalente directo. Esta composición farmacéutica puede administrarse (como un fármaco) mediante procedimientos apropiados conocidos por el experto. La vía de administración es preferentemente la administración parenteral, en particular mediante inhalación (aerosol) o administración intravenosa. Para la administración parenteral, la composición farmacéutica para su uso en la presente invención se proporciona en forma de dosis unidad inyectable, por ejemplo como solución, suspensión o emulsión, formulada junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente. La dosificación y el procedimiento de administración, no obstante, dependen del paciente individual que se va a tratar. En general, el péptido para su uso según la presente invención se administra a una dosis de entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferentemente entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, del modo más preferente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente, la composición se administrará como una dosificación de inyección en embolada por vía intraperitoneal. También puede aplicarse una infusión continua. En este caso, el péptido se administra a una dosis de 5 a 20 µg/kg/minuto, más preferentemente de 7-15 µg/kg/minuto de infusión.  
 45 Según la presente invención, un péptido particularmente preferente para su uso según la presente invención (también denominado "AP 301") tiene la secuencia de aminoácidos siguiente:

SEC ID N°: 1

(NH<sub>2</sub>) Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-

Tyr-Cys (COOH) .

La invención se describe adicionalmente mediante los ejemplos siguientes y las figuras mostradas, pero sin limitación.

La Fig. 1 muestra la vasorrelajación inducida por acetilcolina en arterias coronarias septales contraídas con U46619 de ratas de control, tratadas con estreptozocina (STZ) o tratadas con péptido TIP + STZ, 4 semanas después de inyección STZ (n=3);

La Fig. 2 muestra que el tratamiento con péptido TIP no afecta a los niveles de glucosa en sangre en ratas tratadas con STZ (n=3);

La Fig. 3 muestra que el tratamiento con péptido TIP reduce ligeramente y de un modo dependiente de la dosis el volumen de orina de ratas tratadas con STZ (n=3);

La Fig. 4 muestra imágenes de microscopía de fluorescencia de corazones de ratas perfundidas (Langendorff) con FITC-BSA;

- 5 La Fig. 5 muestra el efecto de péptido TIP (125 µg/rata en un periodo de 4 semanas i.p) sobre la permeabilidad cardiaca (evaluado mediante la incorporación de albúmina- FITC usando el procedimiento de Langendorff).

### Ejemplos:

1. Efecto de péptido derivado de TNF sobre la relajación endotelial durante diabetes inducida por estreptozocina en ratas

- 10 La estreptozocina (STZ) es un antibiótico que puede provocar la destrucción de células β pancreáticas, por lo que se usa experimentalmente ampliamente como agente capaz de inducir diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM), también conocida como diabetes mellitus de tipo 1 (T1DM).

15 En este experimento, se dividieron ratas macho Sprague-Dawley (240 a 265 g, n=3) en tres grupos: 1. ratas de control que recibieron solo inyecciones de vehículo, 2. ratas que se volvieron diabéticas con STZ (50 mg/kg, por vía intraperitoneal) y 3. ratas tratadas con STZ tratadas conjuntamente con péptido TIP (125 µg, i.p.) cada tres días, partiendo de dos días antes de la inyección STZ, durante cuatro semanas. Se consideró que las ratas con niveles en sangre > 350 mg/dl eran diabéticas. Las arterias coronarias septales de las ratas se prepararon tal como se ha descrito previamente (Romero y col., 2008). De forma sucinta, se montaron segmentos de arteria coronaria vascular en un miógrafo de recipiente pequeño (Danish Myo Technology), contraídos con análogo de tromboxano A2 U46619

20 9,11-dideoxi-9a,11a-metanoepoxi-prostaglandina F2a

Denominación química: ácido (5Z)-7-[(1R,4S,5S,6R)-6-[(1E,3S)-3-hidroxi-1-octenil]-2-oxabicyclo[2.2.1]hept-5-il]-5-heptenoico

25 y se analizaron para determinar su capacidad de relajación en respuesta a concentraciones progresivas de acetilcolina. Las respuestas vasorrelajantes se expresaron como porcentaje de la relajación de control máxima. Tal como se muestra en la Fig 1, las arterias coronarias septales de ratas con diabetes inducida por STZ mostraron una capacidad de vasorrelajación significativamente reducida en comparación con las ratas de control. El tratamiento conjunto de las ratas diabéticas con el péptido TIP derivado de TNF AP301 mejoró significativamente la respuesta de vasorrelajación en las arterias coronarias septales. Este modelo animal de diabetes reconocido muestra que el péptido TIP derivado de TNF AP301 puede mejorar la vasorrelajación endotelial durante la diabetes.

30 El efecto del tratamiento con péptido TIP según la presente invención en estas ratas sobre los niveles de glucosa en sangre, la tensión arterial, el volumen de orina y el peso también se investigó (Fig. 2 y 3). Los animales tratados con péptido TIP tenían niveles de glucosa comparables a los del grupo de STZ, pero tenían un volumen de orina inferior y una tensión arterial superior al grupo de STZ. También mostraron una pérdida de peso aumentada. El péptido TIP según la presente invención también muestra permeabilidad cardiaca asociada con STZ in vivo.

35 Siguiendo el mismo protocolo que anteriormente, se aislaron corazones de ratas control, tratadas con STZ y tratadas con TIP/STZ después de 4 semanas. Los corazones se perfundieron usando el procedimiento de Langendorff con BSA-FITC (Di Napoli y col., Nitric Oxide 16 (2007), 228-236). Los corazones se congelaron subsiguientemente en nitrógeno líquido y se cortaron en lonchas con una microtoma. Subsiguientemente, se evaluó la fluorescencia en 4 lonchas de cada corazón y se registraron las respuestas de fluorescencia acumulativas. Tal como se muestra en la Fig. 4 y 5, el péptido TIP AP301 inhibe significativamente la hiperpermeabilidad cardiaca: La microscopía de fluorescencia de ventrículos de corazones de ratas perfundidas con FITC-albúmina detectaron significativamente menos tinte de fluorescencia en presencia de péptido TIP (Fig. 5) en comparación con experimentos sin péptido TIP (Fig. 4).

40

45 Con el presente modelo animal pudo mostrarse que la diabetes de tipo I inducida por STZ causa disfunción vascular, que se caracteriza por vasorrelajación dependiente de endotelio e hiperpermeabilidad alteradas en el corazón.

Los datos proporcionados con el presente modelo animal muestran que el tratamiento con un miembro representativo de los péptidos según la presente invención (el "péptido TIP"; "AP301"; SEC ID N°:1) pudo tratar y prevenir eficazmente complicaciones vasculares diabéticas en estos animales. Estos datos apoyan que el tratamiento con los péptidos según la presente invención es un enfoque prometedor para nuevas terapias para el

50 tratamiento de complicaciones vasculares diabéticas también en pacientes humanos.

2. Evaluación ex vivo de propiedades proinflamatorias del péptido AP301 en sangre humana completa.

Se realizó un estudio farmacológico de seguridad ex vivo del péptido AP301 en sangre completa humana para evaluar si el péptido AP301 da como resultado la liberación del marcador proinflamatorio interleucina-6 (IL-6) a partir de sangre completa humana nueva (es decir, si APN 301 muestra actividad inflamatoria específica de TNF).

En este estudio, se ha usado sangre completa humana nueva, ya que representa un sistema de modelo predictivo para la evaluación de respuesta inflamatoria in vivo.

Resumen de la metodología

5 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de señalización proinflamatoria del péptido AP301. Se usaron cultivos de sangre y la secreción de interleucina-6 (IL-6), un marcador muy sensible para la estimulación proinflamatoria, se cuantificó mediante ELISA.

Sistema de ensayo

Sistema de ensayo se usaron 25 ml de sangre heparinizada recién extraída de 5 voluntarios sanos (VS) en estos ensayos.

10 Objeto de ensayo

Identificación péptido AP301 (dosis: 1ng/ml a 10 µg/ml; una única administración en solución)

Descripción polvo blanco, pureza del 96 %

**Cultivos de sangre completa**

15 Se realizaron cultivos de sangre completa (WB) pipeteando 1 ml de WB en pocillos de placas de 24 pocillos. En cada experimento se incluyeron cultivos sin estimular y estimulados con control.

Cuando fue posible, las sustancias y los estimulantes que se van a investigar se añadieron siempre en un volumen idéntico a cada pocillo de un experimento dado, no superior al 10 % del volumen total del pocillo. Los controles sin estimular recibieron PBS. Los ajustes de volumen y las diluciones para diferentes tratamientos se realizaron también con PBS.

20 El contenido de cada pocillo se mezcló y las placas se incubaron a 37 °C y el 5 % de CO<sub>2</sub> durante 24 horas. Después de la incubación, el contenido de cada pocillo se transfirió a un microtubo de 1,5 ml nuevo y se centrifugó a 8000 - 9000 x g durante 15 minutos. El sobrenadante de cada muestra se transfirió individualmente a dos microtubos de 1,5 ml y se mantuvo a -20 °C hasta su uso.

Detección de interleucina-6

25 La interleucina-6 se cuantificó mediante un ELISA específico (Juego de ELISA IL-6 humano, BD Biosciences, Cat. No. 555220) usando un anticuerpo IL-6 antihumano como anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección IL-6 antihumano biotinilado, conjugado de avidina-peroxidasa de rábano picante como reactivo enzimático e IL-6 recombinante como patrón. La medición de la absorbancia se realizó a 450 nm usando el lector Packard Fusion Reader.

30 Análisis de los datos

Los resultados de cada placa se almacenaron y se evaluaron usando el programa de análisis de datos FusionDataAnalysis.

Resumen de los resultados del estudio

35 El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de señalización proinflamatoria del péptido AP301. Se usaron cultivos de sangre completa y la secreción de IL-6, un marcador muy sensible para la estimulación proinflamatoria, se cuantificó mediante ELISA.

Muestras de sangre completa de cinco voluntarios sanos se dejaron sin estimular (control negativo), se estimularon con dosis altas y bajas de LPS (controles positivos) o se incubaron con péptido en nueve diluciones semilogarítmicas que variaban de 10 µg/ml a 1 ng/ml.

40 Tabla: Liberación de interleucina-6 a partir de sangre completa humana nueva después de la adición de péptido AP301 y LPS

	Péptido AP301 Concentración de IL-6	Control positivo (LPS) (pg/ml, n = 5)
Concentración 0 (control negativo)	inferior a 0,5	inferior a 0,5
10 mg/ml	inferior a 0,5	195,640
1 mg/ml	inferior a 0,5	108,370

# ES 2 542 227 T3

3 ng/ml	inferior a 0,5	34,867
1 ng/ml	inferior a 0,5	sin determinar

Los resultados revelan claramente que el péptido AP301 no induce ningún nivel detectable de secreción de IL-6 a ninguna de las concentraciones analizadas. Los controles positivos (LPS) dieron como resultado una fuerte inducción de secreción de IL-6.

## Análisis

5 Los experimentos se realizaron para evaluar si el péptido AP301 media la inducción de una respuesta proinflamatoria. Los parámetros de lectura fueron la secreción inducida de IL-6 en cultivos de sangre completa de cinco donantes sanos. Los resultados mostraron claramente que el péptido AP301 no indujo ningún nivel detectable de IL-6 en ninguno de los cultivos de los donantes. Por lo tanto se demuestra que el péptido AP301 no indujo una respuesta proinflamatoria en el modelo ex vivo elegido.

## 10 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Apeptico Forschung und Entwicklung GmbH

<120> Tratamiento de complicaciones vasculares de diabetes

15 <130> R 56271

<160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

20

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> péptido sintético

<400> 1

Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 . 5 10 15

30

Cys

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 542 227 T3

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 2

Lys Ser Pro Gly Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys  
1 5 10 15

Pro Trp Tyr Glu  
20

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 3

Cys Gly Gln Arg Glu Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10 15

Cys

<210> 4

<211> 6

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 4

Thr Pro Glu Gly Ala Glu  
1 5

<210> 5

<211> 14

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial



<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 5

Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 6

Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 7

Cys Gly Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10 15

Cys

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

ES 2 542 227 T3

<220>

<223> péptido sintético

<400> 8

Cys Gly Gln Lys Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10 15

5

Cys

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> péptido sintético

<400> 9

Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Arg Pro Trp Tyr  
1 5 10 15

15

Cys

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> péptido sintético

<400> 10

25

Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Cys  
1 5 10 15

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

5 <400> 11

Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Cys  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido sintético

15 <400> 12

Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Phe Trp Tyr  
1 5 10 15

Cys

**REIVINDICACIONES**

1. Péptido que consiste en 7-17 aminoácidos e incluye el hexámero TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E, en la que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, en el que el péptido no muestra actividad de unión al receptor de TNF y es cíclico, para su uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.
- 5 2. Péptido que consiste en 7-17 aminoácidos e incluye el hexámero TPEGAE, en el que el péptido no muestra actividad de unión al receptor de TNF y es cíclico, para su uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.
3. Péptido cíclico que consiste en una secuencia de aminoácidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en
- 10 - QRETPEGAEAKPWY  
- PKDTPEGAEELKPWY  
- CGQRETPEGAEAKPWYC y  
- CGPKDTPEGAEELKPWYC
- y fragmentos de al menos siete aminoácidos que contienen el hexámero TPEGAE para la fabricación de un medicamento para su uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes;
- 15 en el que el péptido no muestra actividad de unión al receptor de TNF.
4. El péptido para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para el tratamiento de micro- y macroangiopatía, infarto de miocardio, hiperpermeabilidad cardiaca microvascular, apoplejía, neuropatía, retinopatía, nefropatía o enfermedad del pie diabético en un paciente con diabetes.
- 20 5. El péptido para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** tiene la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y está ciclado a través de los residuos de C.
6. El péptido para su uso según la reivindicación 5, **caracterizado porque** está ciclado mediante un enlace disulfuro entre los residuos de C.
- 25 7. Composición farmacéutica que comprende un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y un vehículo farmacéutico para su uso en el tratamiento o la prevención de complicaciones vasculares en pacientes con diabetes.

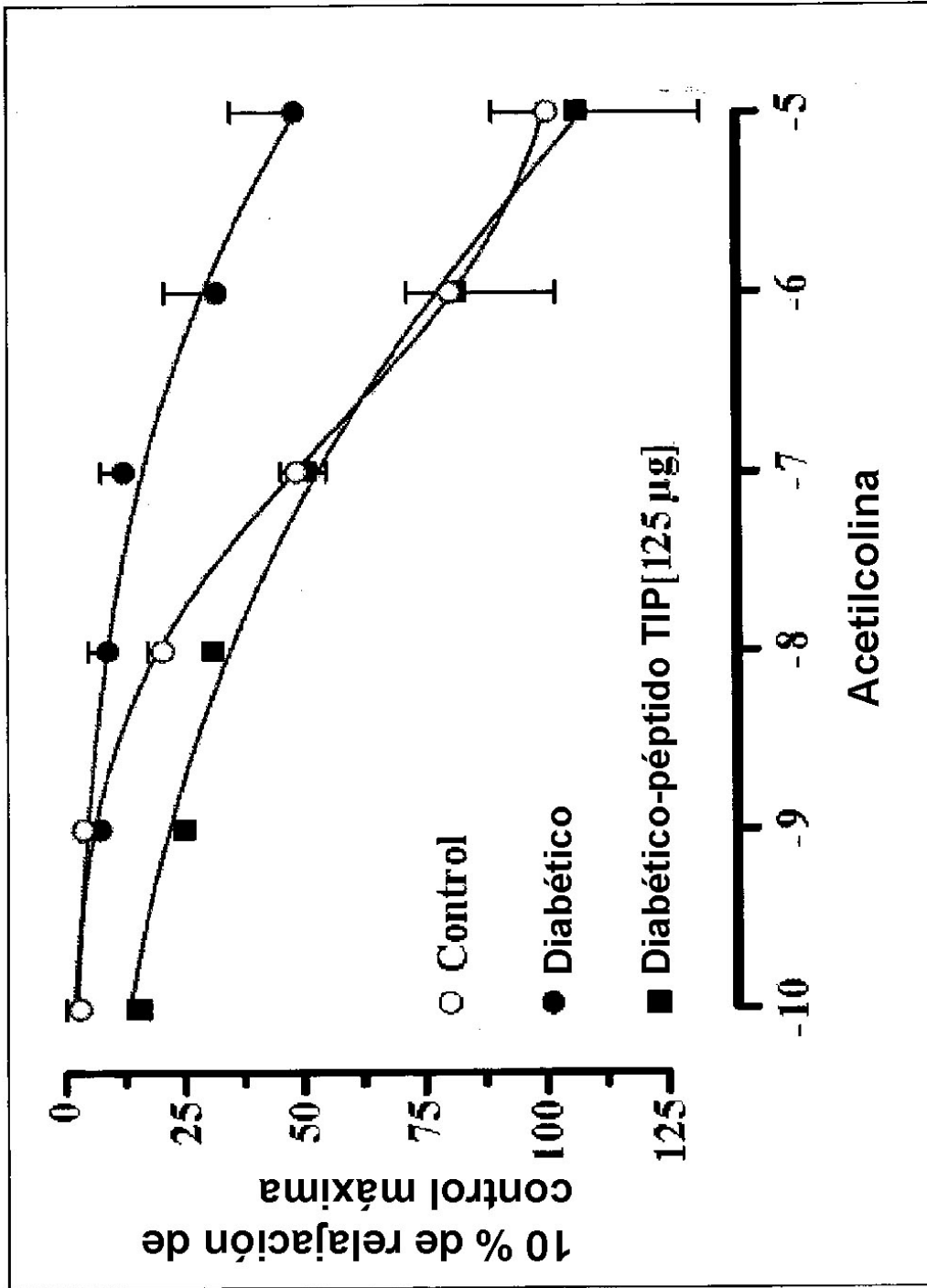
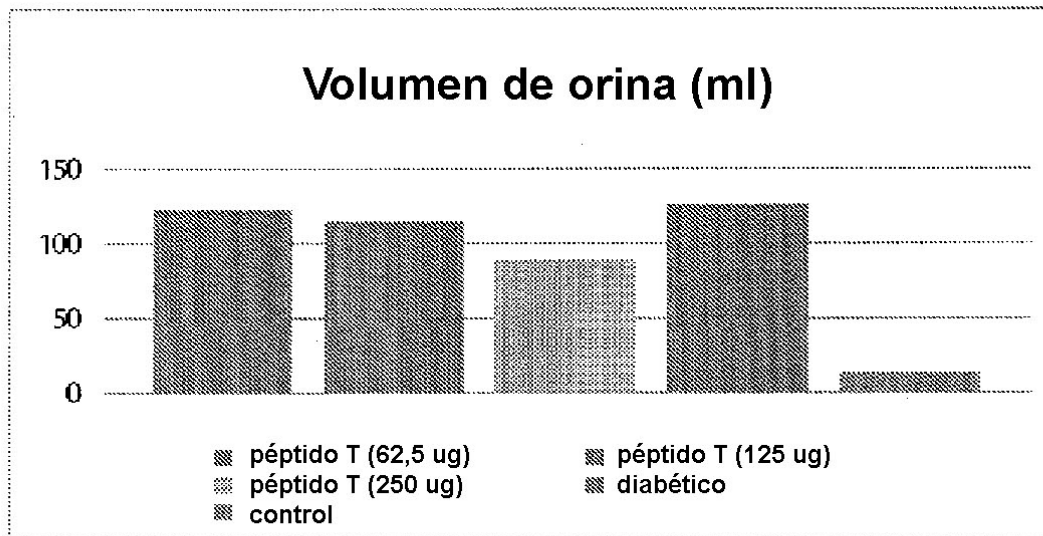
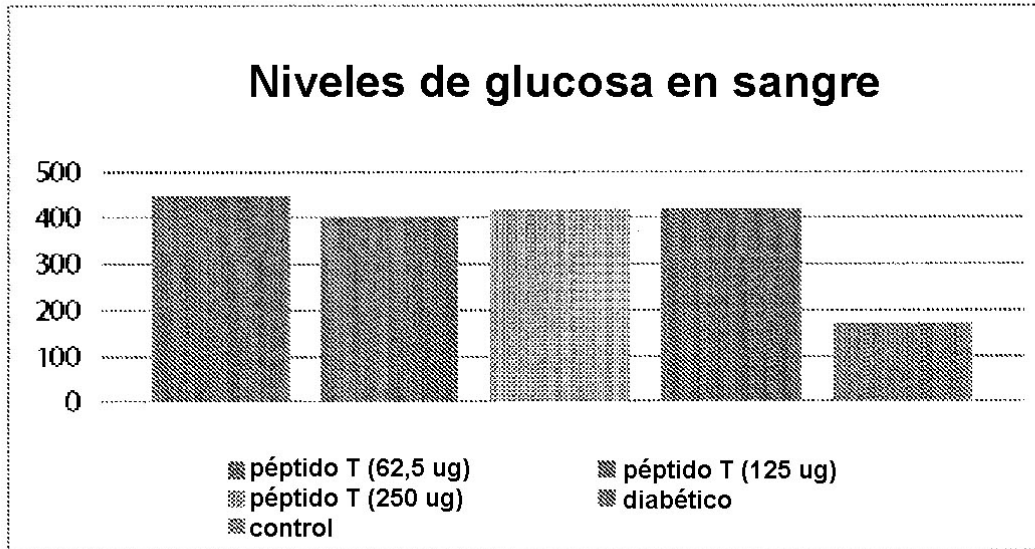
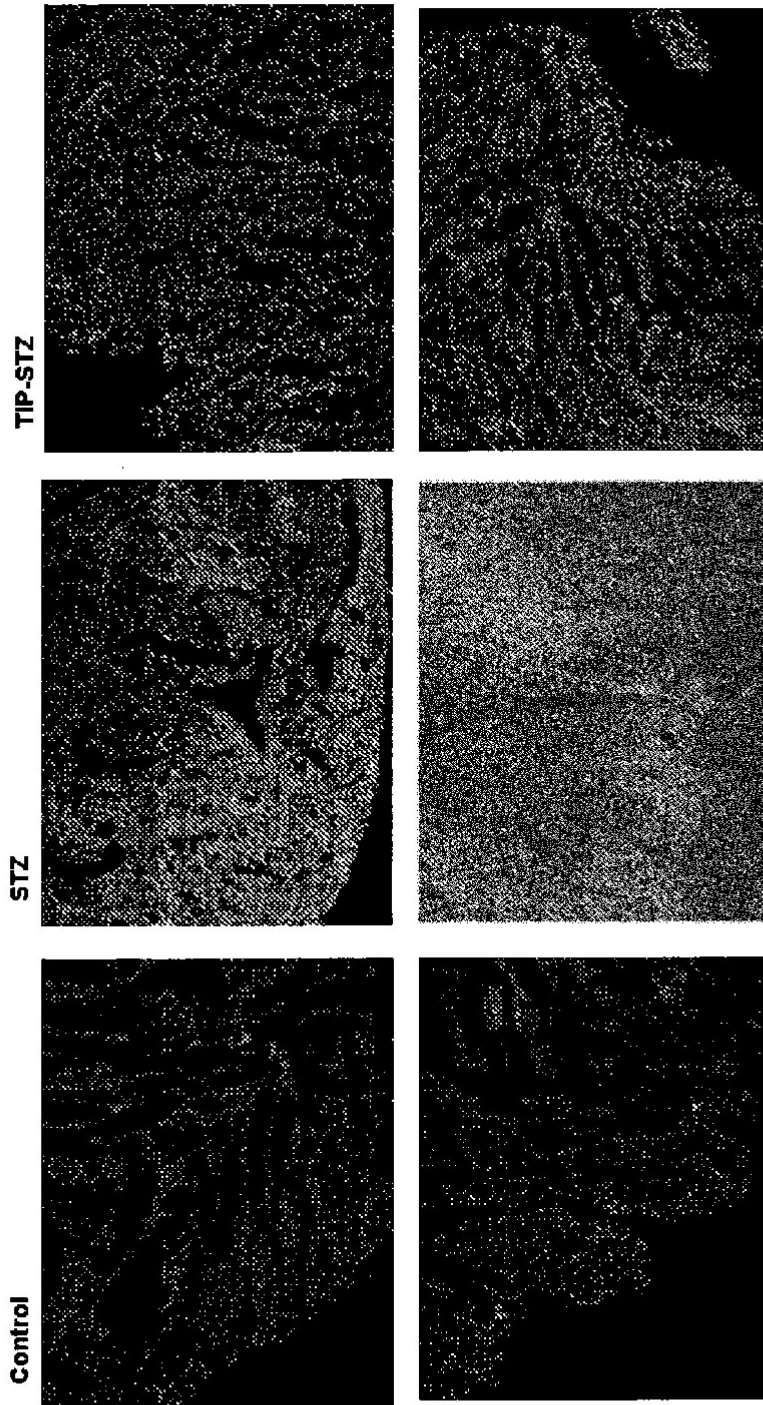


Fig. 1

**Fig. 2**



**Fig. 3**



**Fig. 4**

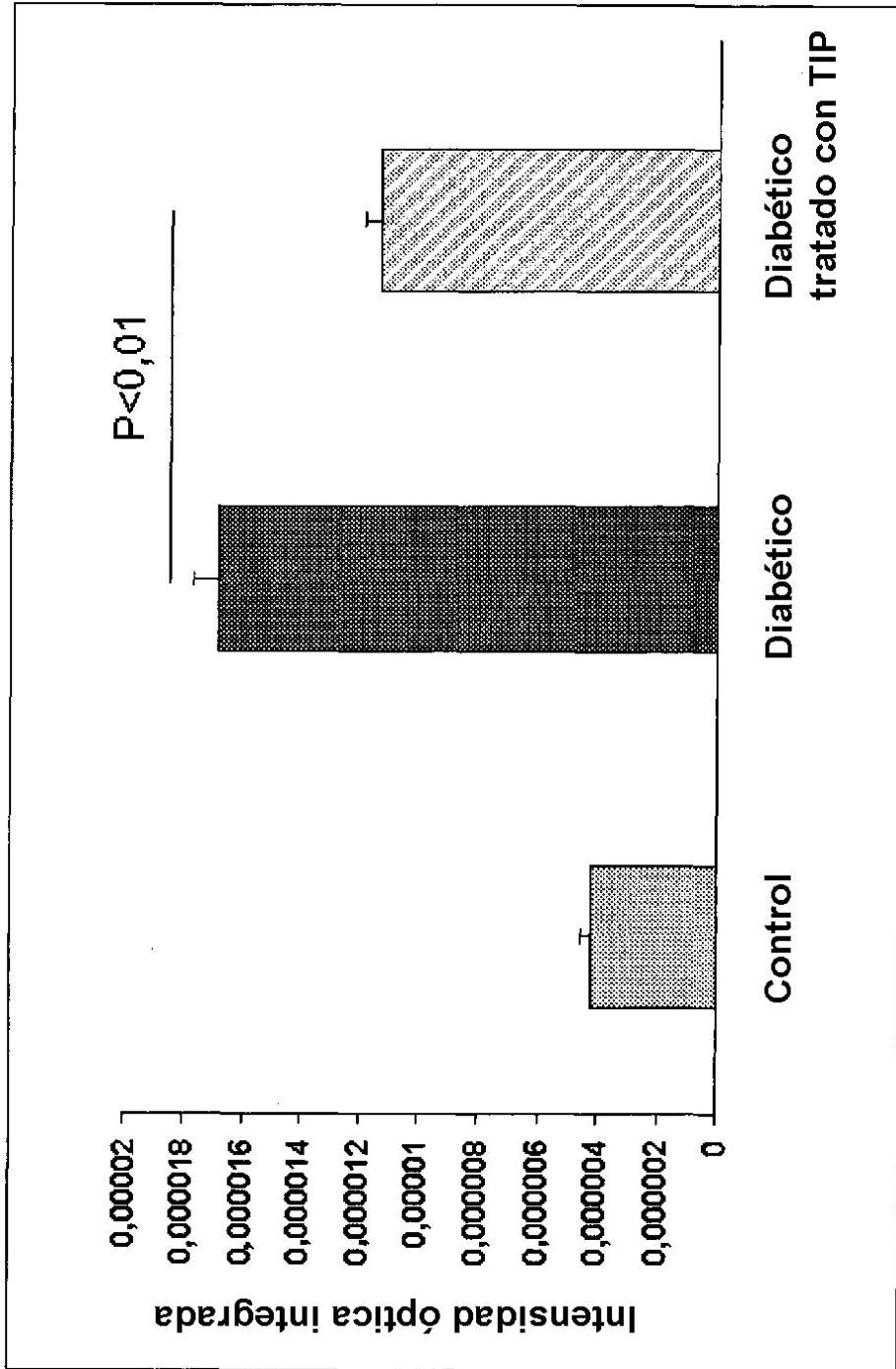


Fig. 5