

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 197**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 11/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.06.2013 PCT/EP2013/062777**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14001177**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.06.2013 E 13730877 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.08.2016 EP 2866824**

54 Título: **Composición farmacéutica para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña causada por falta de oxígeno y presión atmosférica reducida**

30 Prioridad:

**28.06.2012 EP 12173983**

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

**20.02.2017**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD;  
LUCAS, RUDOLF y  
FISCHER, HENDRIK**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 602 197 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**

Composición farmacéutica para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña causada por falta de oxígeno y presión atmosférica reducida

5 La presente invención se refiere al tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña causada por falta de oxígeno y presión atmosférica reducida.

El mal de montaña se puede presentar en seres humanos desde una altura de más de 2500 m por encima del nivel del mar. A una altura superior a 2500 metros, la concentración de oxígeno y la presión atmosférica disminuyen de manera considerable. Se realiza una diferenciación entre las formas cerebrales y pulmonares de mal de montaña agudo. El mal de montaña agudo, por lo tanto, se presenta en el cerebro y también en el pulmón. La primera descripción clínica detallada de mal de montaña se llevó a cabo durante una expedición al Mont Blanc en 1891. Por lo menos 10 cuatro miembros de la expedición presentaron mal de montaña, muriendo uno de los miembros el 2 de septiembre de 1891 a una altura de 4000 m. A partir de estos casos, el mal de montaña se considera que es una condición clínica individual que pone en peligro la vida.

15 Si no se trata, la forma pulmonar del mal de montaña puede llevar a la muerte en menos de 24 horas, produciéndose la muerte con frecuencia a través de una embolia pulmonar secundaria.

El tratamiento más eficaz para todas las formas de mal de montaña agudo es el suministro de oxígeno, por ejemplo por descenso rápido del enfermo a altitudes más bajas, o por medio de oxígeno embotellado o por medio de una cámara hiperbárica portátil. No obstante, en regiones montañosas con frecuencia no es posible un descenso rápido. La ventilación con oxígeno, por ejemplo con oxígeno embotellado ciertamente reduce la presión arterial pulmonar 20 aumentada, pero no la normaliza. También en el caso de una cámara hiperbárica portátil el efecto positivo es solo temporal. El éxito del tratamiento desaparece en pacientes inmediatamente después de abandonar la cámara hiperbárica cuando se vuelven físicamente activos de nuevo.

Un tratamiento medicamentoso del mal de montaña a día de hoy únicamente es limitado y genera controversia: así, se sugiere dexametasona en mal de montaña agudo grave y también específicamente en la forma cerebral del mal de montaña. Además, se ha discutido si los inhibidores de PDE-5, los cuales se usan para el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar primaria (clasificación de Dana Point 1) también están indicados para la hipertensión pulmonar secundaria a causa de la falta de oxígeno en las alturas (clasificación de Dana Point 3). 25

También se han propuesto posibilidades de tratamiento natural para el mal de montaña (también de modo preventivo) (té de hojas de arbusto de coca; té de mantequilla de yak; preparaciones las cuales contienen ginkgo como principio activo). 30

No obstante, debe hacerse notar que actualmente la posibilidad de tratamiento medicamentoso de la forma pulmonar del mal de montaña aún es muy limitada. Además, se sabe que operaciones de rescate organizadas únicamente se pueden considerar en la región alpina europea y parcialmente también en la región de Norteamérica. En regiones montañosas alejadas del mundo y en altitudes extremas, las operaciones de rescate y el auxilio médico en urgencias (con el uso de oxígeno embotellado o una cámara hiperbárica portátil) son escasamente posibles. El suministro de un tratamiento medicamentoso eficiente de mal de montaña por lo tanto sería necesario con urgencia, también como componente de un paquete de emergencia para montañeros, quienes pueden encontrarse en riesgo de desarrollar mal de montaña. 35

En el documento EP 2 009 023 A1 se proponen péptidos nuevos para el tratamiento de edemas. Estos péptidos se evalúan a este respecto por la prueba de "TEER" (siglas en inglés para "resistencia eléctrica transepitelial") usando células Calu-3, lo cual no constituye un sistema de prueba establecido para eliminación de líquido en edemas pulmonares (eliminación de fluido de edema pulmonar). Las células Calu-3 de hecho son células bronquiales que únicamente constituyen aproximadamente el 1 % de la superficie del pulmón que sirve para intercambio de gases. En contraste, las células alveolares constituyen el 99 % de la superficie del pulmón que sirve para intercambio de gases (Hollenhorst y col., J. Biomed. Biotechnol. 2011 (2011), doi: 10.1155/2011/174306). En contraste con la prueba de TEER, la línea de células epiteliales alveolares humanas A549 se ha establecido como la norma experimental aceptada como un modelo para células epiteliales alveolares (Lazrak y col., Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 278 (2000), L848-57). 40 45

Por lo tanto, un objetivo de la presente invención es mejorar claramente las posibilidades para el tratamiento medicamentoso de pacientes con la forma pulmonar del mal de montaña y poner a disposición un medio mediante el cual esta enfermedad pueda tratarse eficazmente, pero también evitarse. 50

En consecuencia, la presente invención se refiere a un péptido que consiste en de 7-20, especialmente 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E, en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> puede ser cualquier aminoácido natural o no natural, en donde el péptido no tiene actividad de unión de receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación para el tratamiento y la prevención de la forma pulmonar del mal de montaña. 55

Con la presente invención, por primera vez está disponible un tratamiento medicamentoso para la forma pulmonar del mal de montaña. Por lo tanto, una "designación de fármaco huérfano" también se ha otorgado inmediatamente para la presente invención y en concreto tanto por la EMA (EMA/OD/144/12) como por la FDA de EEUU (12-3829). Esto muestra la urgente necesidad de una posibilidad de tratamiento para esta enfermedad, lo cual se cumple con la presente invención.

Los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación en sí ya se conocen desde hace tiempo, por ejemplo, por la patente europea EP 1 264 599 B1, el documento US 2007/299003 A, WO 94/18325 A1, WO 00/09149 A1, WO 2006/013183 A1 o WO 2008/148545 A1. En el transcurso de los experimentos de la presente invención, ahora se ha reconocido que estos péptidos sorprendentemente también son adecuados para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña, de manera que por lo tanto por primera vez se puede poner a disposición para esta indicación una forma de tratamiento medicamentoso sencillo y eficiente.

Estos péptidos –en sí conocidos–, los cuales se usan de acuerdo con la invención, no tienen actividad de unión a receptor de TNF (Hribar y col., Eur. J. Immunol. 1999; Elia y col., ARJCCM 2003; véase también: sección de Ejemplos más adelante) y están ciclados. Las variantes preferidas de estos péptidos consisten en 7-17 aminoácidos adyacentes y contienen el hexámero TPEGAE (SEQ ID NO: 2).

El mal de montaña agudo siempre comienza con hipoxia subaguda. Subsecuentemente, la hipoxemia e hipercapnia llevan a vasodilatación, la hipocapnia a vasoconstricción. En altitud, resultan diferentes efectos ahora de hipoxemia e hipocapnia: en el pulmón predomina la vasoconstricción, en el cerebro, la vasodilatación.

La causa del mal de montaña agudo se encuentra en una adaptación fallida, principalmente en un incremento de ventilación individualmente demasiado reducido (hipoventilación relativa). Las consecuencias son una hipoxemia más marcada, mayor presión arterial pulmonar, mayor presión intracraneal, retención de líquidos y eritropoyesis disminuida.

La forma pulmonar del mal de montaña es causada por falta de oxígeno y presión atmosférica reducida y es un cambio de la función pulmonar que pone en peligro la vida y se presenta principalmente a alturas de entre 2500 y 6000 m. Dos tercios de todos los casos se presentan entre 3000 y 4500 m por encima del nivel del mar. La forma pulmonar del mal de montaña es la causa más frecuente de muerte del mal de montaña agudo.

La forma pulmonar del mal de montaña con frecuencia comienza característicamente después de exceder la altura umbral de aproximadamente 2500 m.

La vasoconstricción hipóxica, heterogénea, excesiva en el pulmón genera áreas hiperperfundidas del pulmón con infiltrados agudos. La hipertensión pulmonar aumentada en gran medida como un resultado de una vasoconstricción hipóxica heterogénea es una expresión, principalmente en áreas periféricas del pulmón, de una respuesta vascular pulmonar hipóxica aumentada en gran medida (HPVR, por sus siglas en inglés) en seres humanos previamente sanos en su totalidad. Un incremento en la presión arterial pulmonar en realidad es fisiológica bajo hipoxia, pero es considerablemente más notable en gran medida en la forma pulmonar del mal de montaña. No obstante, la permeabilidad capilar pulmonar no se incrementa bajo hipoxia.

Esto contrasta claramente con otras enfermedades agudas de pulmón tales como por ejemplo lesión aguda del pulmón (ALI), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS) o edema por hiperpermeabilidad, el cual se puede presentar ya sea en la forma primaria a través de la acción directa de una noxa o una forma secundaria como una consecuencia de otras enfermedades. Las lesiones pulmonares más frecuentes en ALI, ARDS y en edema por hiperpermeabilidad son neumonía bacteriana y viral, contusión del pulmón, aspiración de jugo gástrico, traumatismo por inhalación, intoxicaciones por hábito de fumar, casi ahogamiento, transfusiones de sangre masivas, septicemia, politraumatismo, derivación cardiopulmonar o quemaduras extensas. En estas enfermedades pulmonares, la reacción inflamatoria con lesión concomitante de las paredes alveolares están en primer plano. Esta condición genera una compleja activación de procesos inmunitarios pro- y antiinflamatorios, lo que lleva a lesión inflamatoria del epitelio alveolar y del endotelio de los vasos. Las consecuencias son pérdida de alveolocitos y tensioactivo, la presentación de una fuga capilar con salida de proteínas de plasma y formación de edema intersticial. Los cambios inflamatorios típicamente son como parches y se distribuyen de modo heterogéneo a lo largo de la totalidad del pulmón. La infiltración, el edema intersticial y alveolar finalmente llevan a atelectasias y a signos clínicos de hipoxemia arterial e hipertensión pulmonar. Estas reacciones inflamatorias no tienen significancia patológica en el mal de montaña.

La incidencia de una forma pulmonar clínicamente manifiesta del mal de montaña se encuentra por encima de 3500 m en aproximadamente el 15 %, con mortalidad que se encuentra en el 44 % de los pacientes no tratados.

La incidencia de mal de montaña no se correlaciona con el  $VO_{2m\acute{a}x}$ , el estado de entrenamiento, la presión sanguínea, la alimentación, el hábito de fumar cigarros o la edad (en contraste con la lesión pulmonar aguda (ALI/ARDS), en el cual sobre todo el hábito de fumar cigarros y la edad avanzada representan factores de riesgo considerables), pero ciertamente, de manera parcial con la respuesta de ventilación hipóxica (HVR) individual y con el destino de montaña o la velocidad de ascenso.

Las diferencias entre el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña por una parte y ALI/ARDS por la otra también se han considerado por las autoridades de medicamentos EMA y FDA de EEUU en la autorización de la presente invención como "indicación huérfana" expresamente como base en el examen de estas autorizaciones. Esta diferenciación resulta, por una parte, ya únicamente del sistema de clasificación de diagnóstico internacional (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS): la forma pulmonar del mal de montaña se clasifica bajo el capítulo XIX (lesiones, envenenamientos y otras consecuencias determinadas de causas externas), grupo de enfermedad T66-T78 (Otras lesiones y lesiones no especificadas por causas externas), enfermedad clase T70 (lesiones por presión atmosférica y del agua), subcategoría T70.2 (otras lesiones y lesiones no especificadas por altitud elevada), mientras que ALI/ARDS se clasifica en un capítulo completamente diferente (Capítulo X (enfermedades del sistema respiratorio), grupo de enfermedades J80-J84 (otras enfermedades de los órganos respiratorios que afectan principalmente al intersticio), enfermedad clase J80 (síndrome de dificultad respiratoria del adulto [ARDS])). El campo clínico es diferente (medicina ambiental, ocupacional y deportiva para la forma pulmonar del mal de montaña; anestesia y medicina intensa para ALI/ARDS). La etiología es fundamentalmente diferente. La forma pulmonar del mal de montaña se desarrolla en personas por lo demás sanas sin condiciones clínicas subyacentes o existentes de antemano a través de un ascenso rápido, sin aclimatación por montañeros sanos a alturas superiores a 3000 m o cambios en las condiciones ambientales, mientras que ALI/ARDS es causado por condiciones clínicas previas y como una consecuencia de una fisiopatología subyacente (el paciente padece de antemano de otra condición clínica definible) tal como: infección grave o inflamación, la cual es local o sistémica (por ejemplo, en el caso de septicemia), aspiración (por ejemplo, por jugo gástrico), inhalación de gases calientes o venenosos, transfusiones de sangre múltiples, casi ahogamiento, contusión de pulmón, politraumatismo, quemaduras, embolia grasa, etc.); de igual manera, la fisiopatología. En la forma pulmonar del mal de montaña, una respuesta ventilatoria insuficiente y una fuerte reacción de vasoconstricción poco habitual generan hipoxia, después de lo cual (también debido a hiperactividad simpática (neurogénica)) se presentan presión pulmonar aumentada, estrés endotelial y salida capilar; en ALI/ARDS, la lesión alveolar, la salida de líquido rico en proteínas al espacio intersticial y alveolar y una liberación extensa de citocinas y migración de neutrófilos llevan a un intercambio de gases reducido en el pulmón).

No obstante, principalmente, la forma pulmonar del mal de montaña y ALI/ARDS también difieren en el papel el cual tienen los procesos inflamatorios en estas enfermedades. Los procesos inflamatorios siempre preceden a ALI/ARDS; estos procesos inflamatorios desempeñan un papel principal en la fisiopatología. En contraste, los procesos inflamatorios apenas desempeñan un papel en la forma pulmonar del mal de montaña; se producen, en caso de que suceda, únicamente como un rasgo secundario, pero no como causa de la enfermedad. Mientras que, por lo tanto, en ALI/ARDS una secreción aumentada de moduladores proinflamatorios del endotelio y neutrófilos, respuestas inflamatorias por activación de neutrófilos y liberación de citocinas, un contenido elevado de citocinas y proteínas en el líquido de lavado broncoalveolar (BALF), presencia de neutrófilos y macrófagos en BALF y permeabilidad microvascular aumentada del pulmón causada por una inflamación aguda representan signos claros de inflamación, estos están completamente ausentes por lo menos en la fase inicial de la forma pulmonar del mal de montaña. Los análisis de BALF muestran, en la forma pulmonar del mal de montaña, que no hay incremento en leucocitos o moduladores proinflamatorios y no hay diferencia en la proteína A tensioactiva y la proteína de células Clara.

Finalmente, el diagnóstico de la forma pulmonar del mal de montaña y ALI/ARDS es completamente diferente: La forma pulmonar del mal de montaña se presenta en montañeros no aclimatados sanos y se desarrolla dentro de dos a cinco días después de la llegada a una altitud elevada. Aquí, la presión de las arterias pulmonares está aumentada anormalmente, pero la presión de cuña permanece normal. En ALI/ARDS, como se ha mencionado, siempre existe una condición clínica inicial (por ejemplo, septicemia). La presión de cuña es de  $\leq 18$  mmHg, además generalmente no existe indicación clínica para presión alta auricular izquierda (no hay presión aumentada en la arteria pulmonar); la relación  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  es  $\leq 300$  (ALI) en estado estable.

La forma pulmonar del mal de montaña y ALI/ARDS por lo tanto son dos enfermedades las cuales son completamente diferentes entre sí (Peacock, Eur. Respir. J. 8 (1995), 1819-1821).

Preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido el cual consiste de 7-20, especialmente 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TPEGAE (SEQ ID NO: 2), en donde el péptido no tiene la actividad de unión a receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación en el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña.

Una forma de realización particularmente preferida de la presente invención se refiere a un péptido ciclado para la aplicación que consiste en una secuencia de aminoácidos consecutivos seleccionados del grupo que consiste en

- 55 - QRETPEGAEAKPWY (SEQ ID NO: 3)
- PKDTPEGAEALKPWY (SEQ ID NO: 4)
- CGQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 1),
- CGPKDTPEGAEALKPWYC (SEQ ID NO: 5),
- CGQKETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 6),
- 60 - CGQRETPEGAEARPWYC (SEQ ID NO: 7),
- CGQRETPEGAEAKPC (SEQ ID NO: 8),

- CQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 9),
- CGQRETPEGAEAKFWYC (SEQ ID NO: 10),
- KSPGQRETPEGAEAKPWYE (SEQ ID NO: 11),
- KGQRETPEGAEAKPWYG (SEQ ID NO: 12),
- 5 - ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG (SEQ ID NO: 13),
- ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD (SEQ ID NO: 14),
- β-alanina- GQRETPEGAEAKPWYE (SEQ ID NO: 15)

y fragmentos de por lo menos 7 aminoácidos de los mismos, los cuales tienen el hexámero TPEGAE, para la aplicación o para la producción de un medicamento para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña.

- 10 Preferentemente, el péptido para la aplicación comprende la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 1) y está ciclado vía los residuos C. Este péptido particularmente preferido para la aplicación por lo tanto tiene la siguiente secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 1) (NH<sub>2</sub>)Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys(COOH).

- 15 La ciclación de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación se puede obtener aquí, por ejemplo, ya sea por ciclación directa a través de un puente disulfuro entre los dos residuos C en el extremo N y C o al acoplarse el péptido por medio de ambas cisteínas a una sustancia portadora. Aquí, en los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación los residuos cisteína preferentemente se proporcionan al inicio y al final de la molécula. Otros grupos funcionales los cuales obtienen una ciclación del péptido también se pueden usar, por ejemplo, al llevar un grupo ácido con una amina o un alcohol a un cierre de anillo amida o éster (aquí, por ejemplo, los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico pueden ciclarse con serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina o lisina, preferentemente de manera intramolecular). La ciclación de los péptidos se produce preferentemente a través de un puente disulfuro entre los residuos C del péptido (si están presentes). No obstante, los residuos cisteína u otros grupos funcionales también se pueden proporcionar sobre la sustancia portadora, en particular sobre una proteína portadora, que unen el extremo N o el extremo C de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación y así aseguran la naturaleza cíclica de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación.
- 20
- 25

A este respecto, por supuesto también cualquier referencia a un péptido "de acuerdo con la invención" para la aplicación en la presente es la referencia a un péptido ciclado.

- 30 La ciclación por medio de residuos cisteína se prefiere particularmente, en particular por medio de residuos cisteína los cuales se proporcionan al inicio y al final de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación o se introducen adicionalmente y/o a través de residuos cisteína en un portador, en el extremo N y C del péptido de acuerdo con la invención para la aplicación. La ciclación intramolecular de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación por medio de los residuos cisteína proporcionados o introducidos adicionalmente en el extremo N y C se prefiere particularmente.

- 35 Otros péptidos preferidos de acuerdo con la invención para la aplicación, por lo tanto, son por ejemplo CGQKETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 6), CGQRETPEGAEARPWYC (SEQ ID NO: 7), CGQRETPEGAEAKPC (SEQ ID NO: 8), CQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO: 9) o CGQRETPEGAEAKFWYC (SEQ ID NO: 10).

- 40 Un grupo adicional de péptidos preferidos de acuerdo con la invención para la aplicación son péptidos cíclicos con una secuencia X<sub>1</sub>-GQRETPEGAEAKPWY-X<sub>2</sub>, en donde X<sub>1</sub> representa 1 a 4 aminoácidos, en particular 1 o 3 aminoácidos, estos aminoácidos son aminoácidos naturales o no naturales, en particular, X<sub>1</sub> representa el aminoácido C, K, ornitina, ácido 4-aminobutírico, β-alanina o la secuencia KSP, X<sub>2</sub> puede ser un aminoácido natural o no natural en donde X<sub>2</sub> es en particular el aminoácido C, D, G o E y en donde X<sub>1</sub> es el aminoácido N-terminal y X<sub>2</sub> es el aminoácido C-terminal (GQRETPEGAEAKPWY corresponde a la SEQ ID NO: 18). Son ejemplos particularmente preferidos de esta secuencia X<sub>1</sub>-GQRETPEGAEAKPWY-X<sub>2</sub> los péptidos cíclicos KSPGQRETPEGAEAKPWYE, KGQRETPEGAEAKPWYG, ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG, ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD, β-alanina-GQRETPEGAEAKPWYE.
- 45

- 50 En el péptido cíclico KSPGQRETPEGAEAKPWYE, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el aminoácido C-terminal ácido glutámico (E) al aminoácido N-terminal lisina (K) mientras que el aminoácido N-terminal lisina (K) está conectado con el aminoácido C-terminal ácido glutámico (E) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino épsilon de la cadena lateral de la lisina y el carbono gamma en el grupo lateral del ácido glutámico.

En el péptido cíclico KGQRETPEGAEAKPWYG, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el aminoácido C-terminal glicina (G) al aminoácido N-terminal lisina (K), mientras que el aminoácido N-terminal lisina (K) está conectado con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino épsilon de la cadena lateral de la lisina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina.

- 55 En el péptido cíclico ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el aminoácido C-terminal glicina (G) al aminoácido N-terminal ornitina (Orn), mientras que el aminoácido N-terminal ornitina (Orn) está conectado con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el

nitrógeno del grupo amino delta de la cadena lateral de la ornitina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina.

En el péptido cíclico ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el ácido aspártico C-terminal (D) al aminoácido N-terminal glicina (G), mientras que el ácido aspártico C-terminal (D) está conectado con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 4-aminobutírico por una parte, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 4-aminobutírico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico C-terminal por la otra.

En el péptido cíclico  $\beta$ -alanina-GQRETPEGAEAKPWYE, los aminoácidos están unidos periódicamente desde el ácido glutámico C-terminal (E) al aminoácido N-terminal glicina (G), mientras que el ácido glutámico C-terminal (E) está conectado con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo de la  $\beta$ -alanina por una parte, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la  $\beta$ -alanina y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico C-terminal por la otra.

La ciclación en los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación se puede llevar a cabo, como se ha mencionado, no obstante también por unión del péptido a sustancias portadoras. Se consideran como tales sustancias portadoras de ciclación todas las sustancias habituales de uso farmacéutico las cuales son susceptibles, por ejemplo, de establecer un enlace covalente con los grupos SH de las cisteínas (o con otros grupos presentes de manera natural o introducidos artificialmente, químicamente reactivos, del péptido), en donde las proteínas portadoras establecidas, tales como hemocianina de lapa californiana (KLH), toxina del tétanos, etc., son particularmente adecuadas. Además, se pueden proporcionar residuos bifuncionales adyacentes en el portador (por ejemplo, un grupo ácido adyacente a un grupo amina o alcohol). En este contexto es importante que "ciclar" incluye tanto el cierre de anillo intramolecular como la unión de un portador (del cual se proyecta el péptido unido (al estar unido el extremo N y C del péptido al portador), en donde el péptido ciclado de esta manera muestra la estructura espacial cíclica y está estabilizado en conformidad.

Un grupo de péptidos particularmente preferidos de acuerdo con la invención para la aplicación por lo tanto es el grupo con las SEQ ID NO: 1 y 5 a 15.

Los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación tienen en particular un efecto activador sobre el canal de ión sodio epitelial sensible a amilorida (ENaC). Esta propiedad se puede comprobar ventajosamente con la metodología de acuerdo con Eaton y col., (Fed. Proc. 45 (1986), 2707) y Hamill y col. (Pflugers Arch. 391 (1981), 85-100), como se presenta en la sección de Ejemplos.

Preferentemente, el péptido de acuerdo con la invención para la aplicación para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña se pone a disposición en una composición farmacéutica para la aplicación la cual comprende un portador farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica preferentemente se prepara aquí en una forma la cual es adecuada para la administración a seres humanos.

La expresión "una composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición la cual comprende un péptido, como se define en lo anterior (naturalmente también mezclas adecuadas (es decir, que no interfieran negativamente entre sí) del péptido de acuerdo con la invención para la aplicación con principios activos adicionales; no obstante, se prefiere proporcionar el péptido de acuerdo con la invención para la aplicación como principio activo único, que impide, mejora o sana las condiciones descritas en la presente. En particular, la expresión "una composición farmacéutica" se refiere a una composición la cual tiene un péptido, como se describe en lo anterior, y un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambos términos se pueden usar de manera intercambiable). Son ejemplos adecuados de portadores o excipientes los cuales se conocen por el experto agua, solución salina, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS y citrato de sodio o mezclas de los mismos. Por supuesto, la solución Ringer, solución de dextrosa o soluciones de azúcares no reducibles también se pueden usar; en consecuencia, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa 5 % en solución salina, sustancias que mejoren la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes también son adecuados como estos portadores. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador el cual por sí mismo no induzca la producción de anticuerpos los cuales sean dañinos para el individuo que recibe la composición, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. En la formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la invención, por supuesto, deben seguirse las directrices pertinentes (por ejemplo, la farmacopea (europea o de Estados Unidos)). Aquí, el péptido proporcionado en la composición de acuerdo con la invención para la aplicación, como se menciona, también puede ser ciclado por unión covalente directa a estos portadores.

La composición farmacéutica de acuerdo con la invención para la aplicación se puede administrar (como un medicamento) por cualquier procedimiento adecuado dentro del conocimiento del experto, en particular se prefiere administrar el péptido de acuerdo con la invención para la aplicación o la composición de acuerdo con la invención para la aplicación en el pulmón. La vía de administración preferida es inhalación (a través de aerosoles) pero también la administración intravenosa, instilación, administración oral o combinaciones de las mismas. En el caso de

administración por inhalación, parenteral u oral, el medicamento de esta invención se formula en forma de monodosis, tal como una solución, suspensión o emulsión, en combinación con el excipiente farmacéuticamente aceptable definido antes. La dosificación y manera de administración, no obstante, también pueden por supuesto depender en casos particulares del individuo respectivo.

5 Aquí, la cantidad eficaz necesaria respectivamente se administra al individuo quien requiere la administración. La "cantidad eficaz" aquí debe entenderse como la cantidad la cual es suficientemente eficaz con el fin de obtener el efecto terapéutico o profiláctico pretendido, es decir, por ejemplo, para evitar un empeoramiento adicional de la enfermedad o para tratarlo eficazmente. Generalmente, aquí una parte de un paciente promedio, pero las cantidades eficaces reales de los componentes en la composición se pueden formular de manera que el tipo de administración y la edad, peso, estado del paciente y extensión y progreso de la enfermedad se toman en consideración (por ejemplo, por medio de un protocolo farmacológico convencional adecuado).

10 Preferentemente, por lo tanto, el portador farmacéuticamente aceptable en la composición de acuerdo con la invención para la aplicación se selecciona de agua (de manera particularmente preferible: agua para inyección), sal común, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS, citrato de sodio, solución Ringer, dextrosa, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, sustancias que mejoren la isotonicidad y la estabilidad química, conservantes, proteínas farmacéuticamente aceptables, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos.

15 El medicamento se puede administrar, por ejemplo, de manera que el péptido para la aplicación de la presente invención se suministre en una dosis de entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, de manera más preferible entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, de manera mucho más preferible entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente, se administra como una dosis en embolada. No obstante, también se puede usar una inhalación o infusión continua o una administración mediante administración repetida.

20 Las composiciones particularmente preferidas de acuerdo con la invención para la aplicación contienen el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, en particular de 1 mg a 100 mg.

Las composiciones particularmente preferidas de acuerdo con la invención para la aplicación en forma líquida contienen el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, en particular de 1 mg a 100 mg y están presentes en un volumen de 0,5 a 10 ml, en particular en un volumen de 1 a 5 ml.

25 La composición de acuerdo con la invención para la aplicación preferentemente también se puede administrar en forma seca por medio de un inhalador de polvo. Los ejemplos de inhaladores de polvo los cuales se pueden usar para la presente invención se describen en las patentes US n.º 4.995.385 y 4.069.819; los productos ya establecidos son SPINHALER<sup>®</sup>, ROTAHALER<sup>®</sup>, FLOWCAPS<sup>®</sup>, INHALATOR<sup>®</sup>, DISKHALER<sup>®</sup> y AEROLIZER<sup>®</sup>.

30 La composición de acuerdo con la invención para la aplicación preferentemente también se puede administrar como un aerosol por medio de un nebulizador de líquido. Los ejemplos de estos nebulizadores de líquido son productos establecidos tales como Aeroneb<sup>®</sup> y Pari<sup>®</sup>.

35 De acuerdo con una forma de realización preferida, la composición de acuerdo con la invención para la aplicación se caracteriza porque el péptido está presente en una formulación en polvo nebulizable o en una formulación líquida nebulizable.

40 La invención se explica con detalle adicional por medio de los siguientes ejemplos y las figuras de los dibujos a las cuales, no obstante, por supuesto no se limita.

Muestran:

45 Figura 1: la intensidad de la forma pulmonar del mal de montaña en ratas se determinó 4 horas después de administración intratraqueal de solución salina o péptido de la SEQ ID NO: 1. Control: ratas de control en condiciones de valores normales de oxígeno y presión atmosférica. PBS: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de solución salina. Péptido de la SEQ ID NO: 1 100 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 100 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la SEQ ID NO: 1 300 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 300 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la SEQ ID NO: 1 600 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 600 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1.

50 Figura 2: el contenido de proteína en el líquido de pulmón en ratas se determinó 4 horas después de la administración intratraqueal de solución salina o péptido de la SEQ ID NO: 1. Control: ratas de control en condiciones de valores normales de oxígeno y presión atmosférica. PBS: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de solución salina. Péptido de la SEQ ID NO: 1 100 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 100 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la SEQ ID NO: 1 300 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 300 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la

SEQ ID NO: 1 600 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 600 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1.

Figura 3: apariencia histológica de tejido de pulmón en ratas 4 horas después de administración intratraqueal de solución salina o del péptido de la SEQ ID NO: 1. Control: ratas de control en condiciones de valores normales de oxígeno y presión atmosférica. PBS: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de solución salina. Péptido de la SEQ ID NO: 1 100 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 100 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la SEQ ID NO: 1 300 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 300 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1. Péptido de la SEQ ID NO: 1 600 µg: ratas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos y administración intratraqueal de 600 µg de péptido de la SEQ ID NO: 1.

Figura 4: valores medios de los flujos de Na<sup>+</sup> que fluyen hacia dentro en células A549, en la prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa durante la fase de control a pinzamiento con -100 mV, después de adición del péptido de la SEQ ID NO: 1 ("AP301") (240 nM) y después de la adición de amilorida (100 nM) a la solución del baño. Los valores son valores medios +/- ET.

Figura 5: acción del péptido sintético QRETPEGAEAKPWY (SEQ ID NO: 3, descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, a diferencia de la forma de acuerdo con la invención, no ciclado en este experimento) sobre el flujo de Na<sup>+</sup> en una célula A549 pinzada en el modo de célula completa. Registro original representativo de una célula pinzada con un potencial de retención de -100 mV durante la fase de control y después de la adición del péptido QRETPEGAEAKPWY (300 nM) en la solución del baño.

Figura 6: acción del péptido sintético TKPIELGPDEPKAV (SEQ ID NO: 16; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, a diferencia de los péptidos de acuerdo con la invención, no está ciclado y no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE) sobre el flujo de Na<sup>+</sup> en una célula A549 pinzada en el modo de célula completa. Registro original representativo de una célula pinzada a un potencial de retención de -100 mV durante la fase de control y después de la adición del péptido TKPIELGPDEPKAV (300 nM) en la solución de baño.

Figura 7: acción del péptido cíclico sintético CGTKPIELGPDEPKAVC (SEQ ID NO: 17; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, a diferencia de los péptidos de acuerdo con la invención, no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE) sobre el flujo de Na<sup>+</sup> en una célula A549 pinzada en el modo de célula completa. Registro original representativo de una célula pinzada en el potencial de retención de -100 mV durante la fase de control y después de la adición del péptido cíclico CGTKPIELGPDEPKAVC (300 nM) en la solución del baño.

Figura 8: actividad de los péptidos cíclicos de las SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 como una función de la concentración. En el eje x la concentración se introduce en una escala logarítmica en nM; en el eje y se introduce la corriente de ión sodio (en %).

### Ejemplo 1

Uso del péptido de acuerdo con la invención con la SEQ ID NO: 1 para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña

Con el presente ejemplo, en un modelo de rata experimental del mal de montaña se demuestra que el objetivo de acuerdo con la invención se obtiene por el péptido sintético de acuerdo con la invención (SEQ ID NO: 1) que es administrado a ratas que padecen la forma pulmonar del mal de montaña. El esfuerzo físico en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos, tal como sucede a altitudes elevadas, son los 2 factores principales que generan el desarrollo de la forma pulmonar del mal de montaña. Por lo tanto, el modelo de rata seleccionado, en el cual las ratas llevaron a cabo actividad física en condiciones de oxígeno reducido y presión atmosférica reducida, simula un ascenso físicamente extenuante a altitudes elevadas. Esto se lleva a cabo sin realizar una aclimatación previa. Esto corresponde al escenario tal como el que se encuentra los montañeros quienes padecen la forma pulmonar del mal de montaña a altitudes elevadas. En el modelo usado, las ratas desarrollaron los síntomas típicos de la forma pulmonar del mal de montaña, como se lee en la "intensidad de la forma pulmonar del mal de montaña", la concentración aumentada de proteína en el líquido de pulmón y la apariencia histológica del tejido de pulmón. Además debe hacerse notar que la lesión del pulmón en este modelo no es causado por administración de endotoxinas, microbios u otros agentes los cuales producen lesión en el pulmón. No se produce una inflamación intensificada del pulmón. Además, no se usa una cepa específica de rata para este experimento. Por lo tanto, este modelo de rata es adecuado para investigar un medicamento para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña.

#### Procedimiento

Ratas de laboratorio (ratas Sprague Dawley) llevaron a cabo actividad física a través de estimulación externa durante 48 horas en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos. Aquí, la presión atmosférica se redujo a un valor inferior a 430 Torr, de manera que se simuló una altitud de más de 4500 m. Una aclimatación previa de las ratas a la altura de más de 4500 m no se llevó a cabo. Durante este tiempo, las ratas pudieron llevar a cabo una pausa de 15-20 minutos cada 4 horas con el fin de ingestión de agua y alimento. Después de 48 h de actividad física a la altitud simulada de más de 4500 m, las ratas fueron tratadas por vía intratraqueal con 300 µl/animal de

experimentación del péptido de la SEQ ID NO: 1 (100 µg, 300 µg y 600 µg) o 300 µl de solución salina. Las ratas después pasaron 4 horas adicionales en condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos a una altitud simulada de más de 4500 m. Los pulmones después se extirparon y se determinó la intensidad de la forma pulmonar del mal de montaña (figura 1), el contenido de proteína en el líquido de pulmón se determinó (figura 2) y se determinó la apariencia histológica del tejido de pulmón (figura 3).

#### Resultado

La investigación mostró que la administración intratraqueal del péptido de la SEQ ID NO: 1 a ratas de laboratorio las cuales fueron expuestas a las condiciones de presión atmosférica reducida y concentración reducida de oxígeno, genera una reducción en la intensidad de la forma pulmonar del mal de montaña (figura 1). Esto pudo demostrarse para 100 µg/rata de laboratorio y 600 µg/rata de laboratorio y preferentemente para 300 µg/rata de laboratorio del péptido de la SEQ ID NO: 1.

La investigación mostró, además, que la administración intratraqueal del péptido de la SEQ ID NO: 1 a ratas de laboratorio las cuales fueron expuestas a condiciones de presión atmosférica reducida y concentración de oxígeno reducida, genera una reducción en la concentración de proteína en el líquido de pulmón (figura 2). Esto se pudo demostrar para 100 µg/rata de laboratorio y 600 µg/rata de laboratorio y preferentemente para 300 µg/rata de laboratorio del péptido de la SEQ ID NO: 1.

El examen histológico mostró que las ratas tratadas con solución salina presentaron hinchazón del tejido de pulmón con eritrocitos, donde el tejido de pulmón en ratas después de administración del péptido de la SEQ ID NO: 1 era comparable con tejido de pulmón sano de las ratas control, las cuales no fueron expuestas a las condiciones de oxígeno y presión atmosférica reducidos.

#### Ejemplo 2:

Determinación *ex vivo* de las propiedades proinflamatorias del péptido de acuerdo con la invención con la SEQ ID NO: 1 en sangre completa humana.

Se llevó a cabo un estudio de seguridad *ex vivo* farmacológico con respecto al péptido de la SEQ ID NO: 1 de acuerdo con la invención para la aplicación en sangre completa humana, con el fin de establecer si el péptido de la SEQ ID NO: 1 genera la liberación del marcador proinflamatorio interleucina-6 (IL-6) de sangre completa fresca (es decir, si el péptido de la SEQ ID NO: 1 muestra o no actividad inflamatoria específica para TNF (es decir, actividad de unión del receptor de TNF)). En este estudio se usó sangre completa fresca, este es un modelo de predicción reconocido para la determinación de reacción inflamatoria *in vivo*.

#### Resumen de la metodología

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de la señal proinflamatoria del péptido de la SEQ ID NO: 1. Aquí, se usaron cultivos de sangre completa y la secreción de interleucina-6 (IL-6), un marcador muy sensible para estimulación proinflamatoria, se cuantificó por medio de ELISA.

Sistema de prueba 25 ml de sangre heparinizada recién extraída de 5 sujetos sanos (SS) se usaron en las pruebas.

Objeto de examen identificación: péptido de la SEQ ID NO: 1 (dosis: 1 ng/ml a 10 µg/ml; administración única en solución)

Descripción: polvo blanco, pureza, 96 %

#### Cultivos de sangre completa

Los cultivos de sangre completa (SC) se llevaron a cabo al pipetear 1 ml de SC en pocillos de placas de 24 pocillos. En cada experimento se incluyeron cultivos de control no estimulados y estimulados.

Si es posible, las sustancias y los estimulantes que van a ser examinados siempre se usaron en el mismo volumen en cada pocillo en un experimento dado, el cual es no mayor de 10 % del volumen total en un pocillos. Los controles no estimulados se llevaron a cabo con PBS. El ajuste de volumen y las diluciones para los diferentes tratamientos de igual manera se llevaron a cabo con PBS.

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

#### Comprobación de interleucina-6

Se cuantificó interleucina-6 por medio de una prueba de ELISA específica (Human IL-6 ELISA-Set, BD Biosciences,

Cat. N.º 555220) usando un anticuerpo anti-IL-6 humana como anticuerpo de captura, un anticuerpo de detección anti-IL-6 humana biotinilado, conjugado de avidina-peroxidasa de rábano rusticano como reactivo de enzima e IL-6 recombinante como patrón. La medición de absorción a 450 nm se llevó a cabo en un lector Packard Fusion.

Análisis de datos

- 5 Los resultados de cada placa se almacenaron y evaluaron con el programa de análisis de datos Fusion.

Resumen de los resultados del estudio

El objetivo de este estudio era determinar la capacidad de señalización proinflamatoria del péptido de la SEQ ID NO: 1. Cultivos de sangre completa se usaron y la secreción de IL-6, un marcador muy sensible para proestimulación inflamatoria, se cuantificó por medio de ELISA.

- 10 Las muestras de sangre completa de cinco sujetos sanos se dejaron sin estimular (control negativo), se estimularon con dosis altas y bajas de LPS (controles positivos) o se incubaron con el péptido en nueve diluciones semilogarítmicas de 10 µg/ml a 1 ng/ml. Los resultados se presentan en la siguiente tabla 1:

Tabla: liberación de interleucina-6 de sangre completa fresca con la adición del péptido de la SEQ ID NO: 1 y LPS

Concentración	Péptido de la SEQ ID NO: 1 Control positivo (LPS)	
	Concentración de IL-6 (pg/ml, n = 5)	
0 (control negativo)	menos de 0,5	menos de 0,5
10 mg/ml	menos de 0,5	195,640
1 mg/ml	menos de 0,5	108,370
3 ng/ml	menos de 0,5	34,867
1 ng/ml	menos de 0,5	no determinado

- 15 Los resultados muestran claramente que el péptido de la SEQ ID NO: 1 no induce cantidad detectable alguna de secreción de IL-6 en alguna de las concentraciones probadas. Los controles positivos (LPS) generaron una inducción intensa de la secreción de IL-6.

Discusión

- 20 Los experimentos se llevaron a cabo con el fin de establecer si el péptido de la SEQ ID NO: 1 lleva a cabo la inducción de una cascada proinflamatoria. El parámetro de lectura fue la secreción inducida de IL-6 en cultivos de sangre completa de cinco donantes sanos. Los resultados muestran claramente que el péptido de la SEQ ID NO: 1 no induce nivel detectable de IL-6 en los cultivos de donantes. Por lo tanto, se demuestra que el péptido de la SEQ ID NO: 1 no induce una respuesta proinflamatoria en el modelo *ex vivo* seleccionado y por lo tanto no tiene actividad de unión a receptor de TNF. Esta prueba se puede aplicar para cualquiera de las variantes del péptido de acuerdo con la invención con el fin de establecer el rasgo de libertad de actividad de unión a receptor de TNF.

**Ejemplo 3:** determinación de la bioactividad del péptido de acuerdo con la invención en comparación con la forma no ciclada (y por lo tanto, no de acuerdo con la invención) del péptido y otros péptidos sintéticos los cuales se han propuesto en el estado de la técnica para el tratamiento de edemas, en un análisis de pinzamiento zonal de membrana con células A549.

- 30 Resumen:

En este ejemplo, se determinó la actividad biológica del péptido de acuerdo con la invención para la aplicación con otros tres péptidos sintéticos con respecto a la capacidad para inducción de corriente de sodio. Los péptidos comparativos sintéticos también se propusieron en la solicitud de patente europea EP 2 009 023 A1 como péptidos para el tratamiento de edemas. Para estos péptidos, se supuso en el documento EP 2009 023 A1 que serían capaces de inhibir o reducir la acumulación de exceso de líquido en tejidos. En el documento EP 2 009 023 A1, esta propiedad se investigó por medio de la prueba TEER; dentro del presente ejemplo, esta actividad biológica se investigó en la prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa con células A549.

- 40 Este principio de medición (prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa) refleja el equilibrio de líquido en el pulmón humano de modo significativamente mejor y por lo tanto es un sistema de prueba reconocido para esta cuestión. El equilibrio de líquido en un pulmón humano adulto sano depende de los mecanismos de transporte de iones que llevan a través del epitelio del pulmón, con la participación del transportador de Na<sup>+</sup> en la depuración del líquido alveolar que ha sido documentada en muchos estudios. En particular, aquí, el canal de ión

sodio epitelial (ENaC) sensible a amilorida de células alveolares tipo II se identificó como el regulador principal de la depuración de líquido alveolar.

5 Con el fin de determinar la actividad del canal de ión sodio epitelial (ENaC) sensible a amilorida y para determinar su activación por compuestos biológicos y químicos, la técnica de pinzamiento zonal de membrana de célula completa se estableció como la metodología experimental elegida para la medición del movimiento de ión sodio a través de la membrana apical de las células alveolares para predecir la depuración de líquido alveolar.

10 En consecuencia, en el presente ejemplo, la actividad biológica del péptido de acuerdo con la invención para la aplicación y de tres péptidos sintéticos, QRETPEGAEAKPWY (SEQ ID NO: 3, descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con la forma de acuerdo con la invención no está ciclado en este experimento), TKPIELGPDEPKAV (SEQ ID NO: 16; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación no está ciclado y no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE) y CGTKPIELGPDEPKAVC (SEQ ID NO: 17; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE) se determinó por medio de mediciones de pinzamiento zonal de membrana de célula completa en células A549, una línea celular continua de células tipo II alveolares humanas.

15 Se ha demostrado aquí que ninguno de los péptidos QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC, aunque relacionados en su secuencia primaria con los péptidos proporcionados de acuerdo con la invención para la aplicación, tiene efecto alguno sobre el flujo de sodio y por lo tanto, tampoco un efecto activador sobre el canal de ión sodio epitelial (ENaC) sensible a amilorida, mientras que el péptido de acuerdo con la invención para la aplicación indujo un incremento del flujo de sodio sobre aquel del valor de control cuando se agregó a la solución de baño en una prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa usando células A549. De esta manera, por lo tanto, los tres péptidos comparativos no mostraron efecto sobre el canal de ión sodio epitelial (ENaC) sensible a amilorida, en comparación con el control positivo (péptido de acuerdo con la invención con la SEQ ID NO: 1; CGQRETPEGAEAKPWYC) en una prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa usando células A549, la depuración de líquido alveolar, no obstante, es una consecuencia de este movimiento de ión sodio a través de las células epiteliales alveolares, se puede concluir que estos péptidos de acuerdo con el estado de la técnica –en contraste con el péptido de acuerdo con la invención para la aplicación– no son capaces de reducir los edemas pulmonares, aunque, respectivamente, las variantes particularmente preferidas tanto de los péptidos lineales así como de los cíclicos, los cuales se describen en el documento EP 009 023 A1, se investigaron en el presente ejemplo (QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC, las cuales están indicadas como péptidos de las SEQ ID NO: 18, 76 y SEQ ID NO: 2 en el documento EP 2 009 023 A1). Esto es en su totalidad más remarcable puesto que una actividad en el combate de edemas se atribuye a los péptidos comparativos en el documento EP 2 009 023 A1.

20 Esto muestra, por una parte, que los rasgos proporcionados de acuerdo con la invención, en particular, el ciclado y la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE, son rasgos esenciales de la presente invención. Por otra parte, las presentes investigaciones también justifican dudas corroboradas científicamente respecto a la suposición de que estos péptidos en sí mismos son adecuados para el tratamiento de edemas propuesto en el estado de la técnica. El presente ejemplo, el cual se llevó a cabo por el sistema de prueba de la prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa, el cual es reconocido en el mundo científico especializado, muestra específicamente que el sistema de investigación (la prueba TEER) usado en el documento EP 2 009 023 A1 evidentemente no es adecuado para demostrar esta actividad.

Introducción:

25 El equilibrio de líquido en un pulmón humano adulto sano depende de los mecanismos de transporte de iones a través del epitelio del pulmón, en donde la participación de los transportadores de Na<sup>+</sup> en la depuración de líquido alveolar está bien documentado. En particular, aquí, el canal de Na<sup>+</sup> epitelial (ENaC) sensible a amilorida representa una etapa limitante para la reabsorción de Na<sup>+</sup> a través del epitelio alveolar y desempeña el papel clave en la reabsorción de líquido en el pulmón. Como una depuración mejorada de líquido alveolar genera directamente un pronóstico mejorado y restauración en el caso de un edema pulmonar, la mejora en la actividad de ENaC proporciona una opción terapéutica prometedora para el tratamiento de edemas de pulmón.

30 La solicitud de patente europea EP 2 009 023 A1 propone para esto péptidos tales como QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC (descritos ahí como péptidos de las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 76 y SEQ ID NO: 2) como moléculas nuevas las cuales van a inhibir o reducir la acumulación de exceso de líquido en el tejido.

35 De acuerdo con la solicitud de patente EP 2 009 023 A1, la denominada prueba de resistencia eléctrica transepitelial (TEER) se usó para el cribado de candidatos de principios activos anti-edema de pulmón. La "prueba TEER" no es una prueba establecida para la predicción de depuración de líquido en edemas de pulmón (esta prueba no se puede encontrar en la bibliografía científica pertinente y tampoco tiene relevancia con respecto a las células usadas (células Calu-3) en un modelo para intercambio de gases en el pulmón humano). En el presente ejemplo, además

del péptido de acuerdo con la invención, los péptidos QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC (ciclado) se investigaron por medio de un análisis de pinzamiento zonal de membrana de célula completa, una metodología establecida para la medición de movimiento de iones a través de las membranas celulares y especialmente para la medición del transporte de sodio a través de la membrana celular de células epiteliales alveolares (Eaton y col., Fed. Proc. 45 (1986), 2707; Hamill y col., Pflugers Arch. 391 (1981) 85-100). Aquí, debía probarse si los péptidos pueden activar o no el flujo de sodio epitelial sensible a amilorida en células de pulmón.

La "prueba TEER", como se ha descrito en el documento EP 2 009 023 A1, usa capas de células de células Calu-3. No obstante, las células Calu-3 son células bronquiales. Las células bronquiales representan aproximadamente el 1 % de la superficie del pulmón humano para el intercambio de gases y por lo tanto no representan un modelo apropiado para células epiteliales alveolares, las cuales constituyen aproximadamente el 99 % de la superficie del pulmón humano para el intercambio de gases. En el presente ejemplo se usó la línea de células epiteliales alveolares humana A549, debido a que esta línea celular define la norma experimental aceptada generalmente y se considera en la bibliografía como el modelo de elección para células epiteliales alveolares (Lazrak y col., Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 278 (2000), 848-857).

Procedimiento experimental

Péptidos investigados

Péptido "AP301" (péptido de acuerdo con la invención para la aplicación):

Cyclo-H-Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-  
Pro-Trp-Tyr-Cys-OH (SEQ ID NO: 1)

Péptido sintético QRETPEGAEAKPWY:

H-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-OH (SEQ ID NO: 3, descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con la forma de acuerdo con la invención, no ciclado en este experimento).

Péptido sintético TKPIELGPDEPKAV:

H-Thr-Lys-Pro-Ile-Glu-Leu-Gly-Pro-Asp-Glu-Pro-Lys-Ala-Val-OH (SEQ ID NO: 16; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación no está ciclado y no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE).

Péptido sintético CGTKPIELGPDEPKAVC:

Ciclo-H-Cys-Gly-Thr-Lys-Pro-Ile-Glu-Leu-Gly-Pro-Asp-Glu-Pro-Lys-Ala-Val-Cys-OH (SEQ ID NO: 17; descrito en el estado de la técnica como adecuado para el tratamiento de edemas, no obstante, en contraste con los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación no contiene la secuencia central TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E o TPEGAE).

Síntesis de péptidos

Todos los péptidos en el presente ejemplo se prepararon por síntesis de péptido en fase sólida de acuerdo con la estrategia de protección con fluorenilmetiloxycarbonil/t-butilo en resina de cloruro de 2-clorotritilo. Se usaron diisopropilcarbodiimida y N-hidroxibenzotriazol como reactivos de acoplamiento. Todas las etapas de acoplamiento se llevaron a cabo en N,N-dimetilformamida. Los aminoácidos protegidos se acoplaron en sucesión a la cadena de péptido, comenzando con el aminoácido C-terminal. La desprotección de fluorenilmetiloxycarbonilo se llevó a cabo en piperidina 20 % en N,N-dimetilformamida. La separación del péptido protegido parcialmente, completado, de la resina se llevó a cabo en una mezcla 1:1 de ácido acético y diclorometano.

En el caso del péptido de la SEQ ID NO: 1, después de separación de la resina, la desprotección de cadena lateral se llevó a cabo en ácido trifluoroacético 95 %, agua 5 %, seguido por ciclado del péptido crudo lineal por oxidación de los residuos cisteína terminales por el suministro de oxígeno (O<sub>2</sub> a 1,2 bar) a pH 8,5 durante aproximadamente 100 horas.

El producto peptídico crudo se purificó por cromatografía líquida de presión media de fase inversa (RP-MPLC) en una columna de gel de sílice RP-C18 con un gradiente de acetonitrilo 5 % - 40 %. Finalmente, el contraión trifluoroacetato se substituyó por acetato en una columna Lewatit MP64 (forma acetato). Después de una etapa de lavado final en agua, el péptido purificado se liofilizó como sal acetato y se obtuvo como un polvo blanco a color crema. En el caso del péptido 2, el puente disulfuro intramolecular provocó problemas en la separación de la columna de Lewatit, por lo tanto este péptido cíclico se usó en forma de trifluoroacetato en vez de en forma de acetato.

Caracterización de los péptidos

Las masas moleculares de los péptidos se confirmaron por espectrometría de masas por ionización de electronebulización o MALDI-TOF-EM; la pureza se determinó por cromatografía líquida de alto rendimiento analítica.

Los péptidos se almacenaron a -20 °C.

#### 5 Protocolo de pinzamiento zonal

La prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa usando células A549 se llevó a cabo como se describe en Hazemi y col. (J. Med. Chem. 53 (2010), 8021-8029). Se agregaron soluciones de los péptidos a una solución externa (de baño) en la prueba de pinzamiento zonal de manera que se alcanzó una concentración final de 300 nM. En casos en donde se observaba un incremento en el flujo después de la adición de un péptido dado, se agregó a la solución del baño una solución de amilorida (hasta una concentración final de 100 mM), después de que el flujo alcanzara un estado estacionario, con el fin de diferenciar el flujo sensible a amilorida del insensible a amilorida. El flujo sensible a amilorida después se calculó al restar el valor de flujo después de la adición de amilorida (insensible a amilorida) del valor de flujo del estado estacionario antes de la adición de amilorida. Para cada péptido se llevaron a cabo tres experimentos en diferentes células A549 (n = 3).

#### 15 Resultados

El péptido de acuerdo con la invención para la aplicación; SEQ ID NO: 1 ("AP301"); péptido de control positivo generó, cuando se agregó a una solución de baño en una prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa usando células A549 en una concentración final de 240 nM, un incremento en el flujo de Na<sup>+</sup> activo a partir de un valor de control de 86 pA ± 5 pA (antes de la adición de AP301) a un máximo de 1073 ± 15 pA (después de la adición de AP301). La adición subsecuente de amilorida provocó una reversión del flujo a 36 pA ± 5 pA. Esto demostró que el flujo el cual se ha incrementado por AP301 es el flujo de Na<sup>+</sup> sensible a amilorida (figura 4).

Cuando los tres péptidos comparativos sintéticos, QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC se agregaron en experimentos de pinzamiento zonal de membrana de célula completa independientes usando células A549 a la solución de baño en una concentración final de 300 nM, no se pudo observar efecto sobre el flujo: los valores permanecieron en el intervalo del valor de control (figuras 5 a 7).

#### Discusión de los resultados

En el presente ejemplo se demostró la capacidad del péptido de acuerdo con la presente invención ("AP301") como un control positivo en el incremento del flujo de Na<sup>+</sup> sensible a amilorida en una prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa con células A549. La adición de AP301 a la solución de baño llevó a un incremento en el flujo partiendo de un valor de control de 86 pA ± 5 pA (antes de la adición de AP301) a un máximo de 1073 ± 15 pA (después de la adición de AP301). La adición subsecuente de amilorida provocó una reversión a 36 pA ± 5 pA. Esto muestra que AP301 incrementa el flujo de Na<sup>+</sup> sensible a la amilorida de 50 pA a 1037 pA y por lo tanto confirma el efecto activador de AP301 sobre el canal de Na<sup>+</sup> epitelial (ENaC) sensible a amilorida (véanse también Tzotzos y col., Pulm. Pharmacol. Ther. 26 (2013), 356-363), que está dispuesto en el pulmón apicalmente en células epiteliales alveolares. La activación de ENaC genera un incremento en la recepción de Na<sup>+</sup> desde el líquido alveolar dentro de la capa epitelial, de manera que la fuerza de activación osmótica se incrementa, lo cual refuerza la depuración del líquido alveolar y lleva a que agua fluya desde los alveolos al interior de la capa intersticial bajo el epitelio. En esto se podría basar el mecanismo subyacente al efecto de depuración de líquido alveolar observado de AP301 administrado directamente al pulmón.

Cada uno de los tres otros péptidos comparativos sintéticos QRETPEGAEAKPWY, TKPIELGPDEPKAV y CGTKPIELGPDEPKAVC de igual manera se probó para la capacidad de alterar el flujo de Na<sup>+</sup> cuando se agregó a la solución de baño en una prueba de pinzamiento zonal de membrana de célula completa con células A549. No obstante, a diferencia de AP301, el cual mostró un efecto intensificador inmediato, ninguno de los otros tres péptidos tuvo una influencia sobre el flujo en estas células, incluso en una concentración de aplicación un poco mayor que la del péptido AP301 de acuerdo con la invención para la aplicación (300 nM para los tres péptidos, 240 nM para AP301).

**Ejemplo 4:** activación del canal de ión sodio (ENaC) sensible a amilorida por los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación

Los péptidos SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 de acuerdo con la invención para la aplicación se caracterizaron de manera extensa en estudios basados en células. Estos péptidos cíclicos SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 activan el canal de ión sodio (ENaC) sensible a amilorida en células de pulmón. Por lo cual, la equivalencia de estos péptidos con AP301 investigado previamente en el efecto de acuerdo con la invención se clarifica.

#### Secuencias de péptidos

SEQ ID NO: 1: CGQRETPEGAEAKPWYC: El ciclado del péptido se obtuvo al oxidarse las cisteínas terminales (C) con el desarrollo de un puente sulfuro. SEQ ID NO: 11: KSPGQRETPEGAEAKPWYE: En el péptido cíclico de la

SEQ ID NO: 11, los aminoácidos se unen peptídicamente desde el aminoácido C-terminal ácido glutámico (E) al aminoácido N-terminal lisina (K), mientras el aminoácido N-terminal lisina (K) se conecta con el aminoácido C-terminal ácido glutámico (E) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino épsilon de la cadena lateral de la lisina y el carbono gamma en el grupo lateral del ácido glutámico.

- 5 SEQ ID NO: 12: KGQRETPEGAEAKPWYG: En el péptido cíclico de la SEQ ID NO: 12, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el aminoácido C-terminal glicina (G) al aminoácido N-terminal lisina (K), mientras el aminoácido N-terminal lisina (K) está conectado con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino épsilon de la cadena lateral de la lisina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina.
- 10 SEQ ID NO: 13: Ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG: En el péptido cíclico de la SEQ ID NO: 13, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el aminoácido C-terminal glicina (G) al aminoácido N-terminal ornitina (Orn), mientras que el aminoácido N-terminal ornitina (Orn) está conectado con el aminoácido C-terminal glicina (G) por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino delta de la cadena lateral de la ornitina y el carbono del grupo carboxilo de la glicina.
- 15 SEQ ID NO: 14: Ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD: En el péptido cíclico de la SEQ ID NO: 14, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el ácido aspártico C-terminal (D) al aminoácido N-terminal glicina (G), mientras el ácido aspártico C-terminal (D) está conectado con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo del ácido 4-aminobutírico por una parte, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino del ácido 4-aminobutírico y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico C-terminal, por la otra.

20 SEQ ID NO: 15:  $\beta$ -alanina-GQRETPEGAEAKPWYE: En el péptido cíclico de la SEQ ID NO: 15, los aminoácidos están unidos peptídicamente desde el ácido glutámico C-terminal (E) al aminoácido N-terminal glicina (G), mientras el ácido glutámico C-terminal (E) está conectado con el aminoácido N-terminal glicina por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la glicina N-terminal y el carbono C1 del grupo carboxilo de la  $\beta$ -alanina por otra parte, y por medio de un enlace amida entre el nitrógeno del grupo amino de la  $\beta$ -alanina y el carbono del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico C-terminal, por la otra.

25 SEQ ID NO: 19: CGQREAPAGAAAKPWYC (no de acuerdo con la invención): El ciclado del péptido de la SEQ ID NO: 19 se obtuvo al oxidarse las cisteínas terminales (C) con el desarrollo de un puente sulfuro.

#### Síntesis de péptidos

30 Los péptidos cíclicos SEQ ID NO: 1, 11 a 15 y 19 se prepararon por medio de síntesis en fase sólida Fmoc de modo completamente automático, con seguimiento de las siguientes etapas: acoplamiento secuencial de los aminoácidos; separación selectiva de la fase sólida; purificación y liofilización; ciclado selectivo; separación de los grupos protectores; purificación y liofilización; examen analítico.

35 Los péptidos cíclicos de las SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 (de acuerdo con la invención) y 19 (no de acuerdo con la invención) después se examinaron para pureza y masa por medio de HPLC inversa.

40 La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 1 era del 96,3 % m/z (IEN). La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 11 era 96,3 %. m/z (IEN) 1924,1 (M++1). La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 12 era 98,8 %. m/z (IEN) 1888,2 (M++1). La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 13 era 97,4 % m/z (IEN) 1873,4 (M++1). La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 14 era 99 %. m/z (MALDI-TOF) 1901,6 (M++1). La pureza de la proteína cíclica de la SEQ ID NO: 15 era 99 %. m/z (MALDI-TOF) 1902,7 (M++1). La pureza del péptido cíclico de la SEQ ID NO: 19 era 95 %. m/z (MALDI-TOF) 1778,02 (M++1).

La totalidad de los péptidos de acuerdo con la invención SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 tienen la siguiente característica estructural compartida:

- 45 secuencia:  $X_1$ -GQRETPEGAEAKPWY- $X_2$ ,  
 en donde  $X_1$  representa un aminoácido o 1 a 4 aminoácidos, en particular 1 o 3 aminoácidos, en donde los aminoácidos son aminoácidos naturales o no naturales,  
 en donde  $X_1$  representa el aminoácido C, K, ornitina, ácido 4-aminobutírico,  $\beta$ -alanina o la secuencia KSP,  
 en donde  $X_2$  puede ser un aminoácido natural o no natural,  
 en donde  $X_2$  puede ser el aminoácido C, D, G o E  
 50 y en donde  $X_1$  es el aminoácido N-terminal y  $X_2$  es el aminoácido C-terminal.

#### Investigaciones electrofisiológicas del canal de ión sodio sensible a amilorida (ENaC)

55 Los flujos de ión sodio macroscópicos se derivaron de células epiteliales de pulmón humano A549 con la configuración "célula completa" por medio de la técnica "pinzamiento zonal de membrana" (Hamill y col., Pflugers Arch. 391 (1981), 85-100). Para las derivaciones de flujo en la configuración de "célula completa" se usaron las siguientes soluciones de baño y de electrodo:

solución de baño: metanosulfonato de sodio 135 mM, NaCl 10 mM, KCl 2,7 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,8 mM, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, glucosa 5,5 mM y HEPES 10 mM, pH 7,4.

Solución de electrodo: metanosulfonato de potasio 120 mM, KCl 15 mM, NaCl 6 mM, Mg<sub>2</sub>ATP 1 mM, Na<sub>3</sub>ATP 2 mM, HEPES 10 mM y EGTA 0,5 mM (pH 7,2).

5 Los cubreobjetos con las células cultivadas sobre los mismos se transfirieron a un baño experimental de 1 ml de cabida, se fijaron sobre una tabla de microscopio (Axiovert 100, aumento 400 x) y las células se superfunden con la solución de baño descrita en lo anterior. El flujo después se deriva a partir de una célula adecuada (la cual se adhiere al cubreobjetos). Para esto, un microelectrodo (capilar de vidrio con una abertura de punta pulida por calor definida de aproximadamente 1-3  $\mu\text{m}$ , que corresponde a una resistencia de la punta de electrodo de 3-5 M $\Omega$ )  
 10 rellena con una solución de electrolito se coloca sobre la célula y se succiona la membrana de manera que se forma un "sello de gigaohmios" entre la membrana y el electrodo, con el fin de minimizar la corriente de fuga. Con la configuración de "célula completa", la membrana es penetrada debajo de la punta del electrodo de manera que el flujo, el cual fluye a través de la totalidad de los canales de iones de la célula, se puede medir. Al obtener un "sello de gigaohmios" se aplica un potencial de retención de membrana definido por medio de un preamplificador (CV-4 Headstage, Axon Instruments) y un amplificador (Axopatch 1D, Axon Instr.) y se mide el flujo, el cual fluye aquí a  
 15 través de los canales de iones.

El protocolo de pulso consiste en la hiperpolarización de la membrana celular a -100 mV durante 5 s y después despolarización paso a paso en etapas de 20 mV hasta +100 mV.

20 Este protocolo se llevó a cabo antes (control) y después de la adición de las proteínas cíclicas. Las derivaciones de flujo obtenidas así se almacenan y analizan por medio del programa PCLAMP 6.0. Para esto, las derivaciones de flujo obtenidas en presencia de amilorida se restan de los flujos registrados previamente de manera que el flujo de sodio sensible a amilorida a través de los canales de sodio epiteliales se puede determinar.

Los resultados de las mediciones se resumen en la Tabla 1. La actividad de los péptidos individuales está indicada como CE<sub>50</sub> (en nM). La CE<sub>50</sub> es la concentración eficaz a la cual se mide el 50 % de la actividad máxima (es decir, incremento máximo de la intensidad de flujo, I).  
 25

Tabla 1. Actividad de los péptidos de acuerdo con la invención para la aplicación SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 11-15 y del péptido de la SEQ ID NO: 19 no de acuerdo con la invención para la aplicación sobre el flujo de ión sodio sensible a amilorida celular. La actividad está indicada como concentración eficaz al 50 % de la actividad máxima (CE<sub>50</sub>).  
 30

Péptido cíclico	CE <sub>50</sub> (nM)
SEQ ID NO: 1	54
SEQ ID NO: 11	56
SEQ ID NO: 12	38
SEQ ID NO: 13	45
SEQ ID NO: 14	24
SEQ ID NO: 15	19
SEQ ID NO: 19	Sin actividad

La actividad de los péptidos cíclicos SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 como una función de la concentración se representa en la figura 8. La actividad máxima se indica con el 100 %.

35 Las investigaciones ilustradas muestran que los péptidos SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 de acuerdo con la invención para la aplicación son biológicamente activos, mientras que el péptido de la SEQ ID NO: 19, no de acuerdo con la invención, no es activo. La diferencia entre los péptidos cíclicos de las SEQ ID NO: 1 y 11 a 15 y el péptido cíclico de la SEQ ID NO: 19 consiste en que dentro de la secuencia peptídica general X<sub>1</sub>-GQRETPEGAEAKPWY-X<sub>2</sub>, el aminoácido T (en la 5<sup>a</sup> posición) y el aminoácido E (en la 7<sup>a</sup> posición) y el aminoácido E (en la 10<sup>a</sup> posición) se ha sustituido con alanina. La secuencia TPEGAE por lo tanto es esencial. La estructura de X<sub>1</sub> y X<sub>2</sub> no tiene influencia  
 40 esencial sobre la actividad.

Resumen de las secuencias:

- SEQ ID NO: 1 CGQRETPEGAEAKPWYC
- SEQ ID NO: 2 TPEGAE
- SEQ ID NO: 3 QRETPEGAEAKPWY
- SEQ ID NO: 4 PKDTPEGAELKPWY
- 5 SEQ ID NO: 5 CGPKDTPEGAELKPWYC
- SEQ ID NO: 6 CGQKETPEGAEAKPWYC
- SEQ ID NO: 7 CGQRETPEGAEARPWYC
- SEQ ID NO: 8 CGQRETPEGAEAKPC
- SEQ ID NO: 9 CQRETPEGAEAKPWYC
- 10 SEQ ID NO: 10 CGQRETPEGAEAKFWYC
- SEQ ID NO: 11 KSPGQRETPEGAEAKPWYE
- SEQ ID NO: 12 KGQRETPEGAEAKPWY
- SEQ ID NO: 13 Ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG
- SEQ ID NO: 14 ácido 4-aminobutanoico GQRETPEGAEAKPWYD
- 15 SEQ ID NO: 15 β-alanina-GQRETPEGAEAKPWYE
- SEQ ID NO: 16 TKPIELGPDEPKAV
- SEQ ID NO: 17 CGTKPIELGPDEPKAVC
- SEQ ID NO: 18 GQRETPEGAEAKPWY
- SEQ ID NO: 19 CGQREAPAGAAAAPWYC
- 20 SEQ ID NO: 20 TXEXXE

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG GMBH
  - 25 <120> Composición farmacéutica para el tratamiento de la forma pulmonar del mal de montaña causada por falta de oxígeno y presión atmosférica reducida
  - <130> R 63872
  - 30 <150> EP 12173983.3
  - <151> 28-06-2012
  - <160> 20
  - 35 <170> PatentIn versión 3.5
  - <210> 1
  - <211> 17
  - <212> PRT
  - 40 <213> Secuencia artificial
  - <220>
  - <223> Péptido sintético
  - 45 <400> 1
- |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| <b>Cys</b> | <b>Gly</b> | <b>Gln</b> | <b>Arg</b> | <b>Glu</b> | <b>Thr</b> | <b>Pro</b> | <b>Glu</b> | <b>Gly</b> | <b>Ala</b> | <b>Glu</b> | <b>Ala</b> | <b>Lys</b> | <b>Pro</b> | <b>Trp</b> | <b>Tyr</b> |
| 1          |            |            |            | 5          |            |            |            |            | 10         |            |            |            |            | 15         |            |
- Cys**
- <210> 2
  - <211> 6
  - <212> PRT
  - <213> Secuencia artificial
  - <220>
  - 55 <223> Péptido sintético
  - <400> 2

ES 2 602 197 T3

**Thr Pro Glu Gly Ala Glu**  
**1 5**

5 <210> 3  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 3

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

15 <210> 4  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 4

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

25 <210> 5  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 5

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

**Cys**

40 <210> 6  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 <400> 6

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

**Cys**

50

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 5  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 10  
 <400> 7  
 Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Arg Pro Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Cys  
 <210> 8  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 15  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 20  
 <400> 8  
 Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 9  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 25  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 30  
 <400> 9  
 Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Cys  
 1 5 10 15  
 <210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 40  
 <220>  
 <223> Péptido sintético  
 45  
 <400> 10  
 Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Phe Trp Tyr  
 1 5 10 15  
 Cys  
 <210> 11  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 50



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

**Asp**

5 <210> 15  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Péptido sintético

15 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (1)..(1)  
 <223> beta-Ala

<400> 15

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

**Glu**

20 <210> 16  
 <211> 14  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

25 <220>  
 <223> Péptido sintético

30 <400> 16

**Thr Lys Pro Ile Glu Leu Gly Pro Asp Glu Pro Lys Ala Val**  
**1 5 10**

35 <210> 17  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Péptido sintético

<400> 17

**Cys Gly Thr Lys Pro Ile Glu Leu Gly Pro Asp Glu Pro Lys Ala Val**  
**1 5 10 15**

**Cys**

45 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido, que consiste en 7-20, especialmente 7-17 aminoácidos adyacentes y que comprende el hexámero TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E, en donde X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, en donde el péptido no presenta ninguna actividad de unión a receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación en el tratamiento y la prevención de la forma pulmonar del mal de montaña.
2. Péptido para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido consiste en 7-20, especialmente 7-17 aminoácidos adyacentes y comprende el hexámero TPEGAE.
- 10 3. Péptido para la aplicación de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido ciclado consiste en una secuencia de aminoácidos consecutivos que se seleccionan del grupo que consiste en CGQRETPEGAEAKPWYC, CGPKDTPEGAEAKPWYC, CGQKETPEGAEAKPWYC, CGQKETPEGAEAKPWYC, CGQRETPEGAEARPWYC, CGQRETPEGAEAKPC, CQRETPEGAEAKPWYC, CGQRETPEGAEAKFWYC, KSPGQRETPEGAEAKPWYE, KGQRETPEGAEAKPWYG, ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG), ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD, β-alanina-GQRETPEGAEAKPWYE y fragmentos de por lo menos 7 aminoácidos de los mismos, cuyos fragmentos presentan el hexámero TPEGAE.
- 15 4. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado porque** el péptido comprende la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y está ciclado por medio de los residuos C.
5. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** el péptido está ciclado por un puente disulfuro entre los residuos C.
- 20 6. Composición farmacéutica para la aplicación en el tratamiento y para evitar la forma pulmonar del mal de montaña, que contiene un péptido como se define en una de las reivindicaciones 1 a 5, **caracterizada porque** se formula en una composición farmacéutica la cual es adecuada para administración a seres humanos y comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 7. Composición farmacéutica para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizada porque** comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable el cual se selecciona de agua, en particular agua para inyección, sal común, fosfato de sodio, acetato de sodio, carbonato de sodio, citrato, glicina, glicilglicina, histidina, lisina, arginina, TRIS, citrato de sodio, solución Ringer, dextrosa, manitol, trehalosa, sacarosa, sorbitol, fructosa, maltosa, lactosa o dextrano, solución de Hank, aceites fijados, oleato de etilo, sustancias las cuales mejoran la isotonicidad y la estabilidad química, conservantes, proteínas farmacéuticamente aceptables, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos.
- 30 8. Composición farmacéutica para la aplicación de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7 **caracterizada porque** comprende el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, especialmente de 1 mg a 100 mg.
- 35 9. Composición farmacéutica para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 8, **caracterizada porque** está presente en forma líquida y comprende el péptido en una cantidad de 1 µg a 10 g, preferentemente de 10 µg a 1 g, especialmente de 1 mg a 100 mg y está presente en un volumen de 0,5 a 10 ml, especialmente en un volumen de 1 a 5 ml.
10. Composición farmacéutica para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 6 a 9, **caracterizada porque** el péptido está presente en una formulación en polvo nebulizable o en una formulación líquida nebulizable.

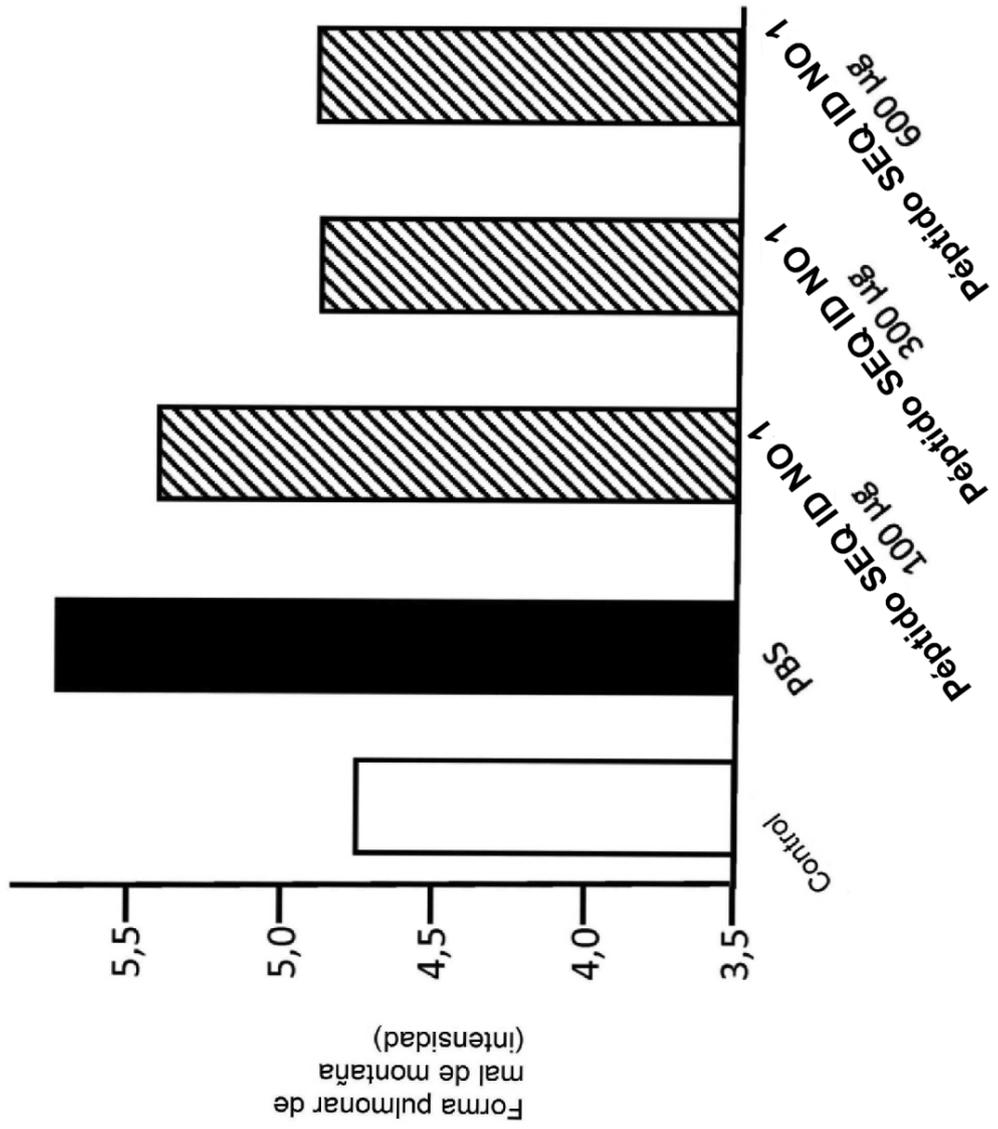


Fig. 1

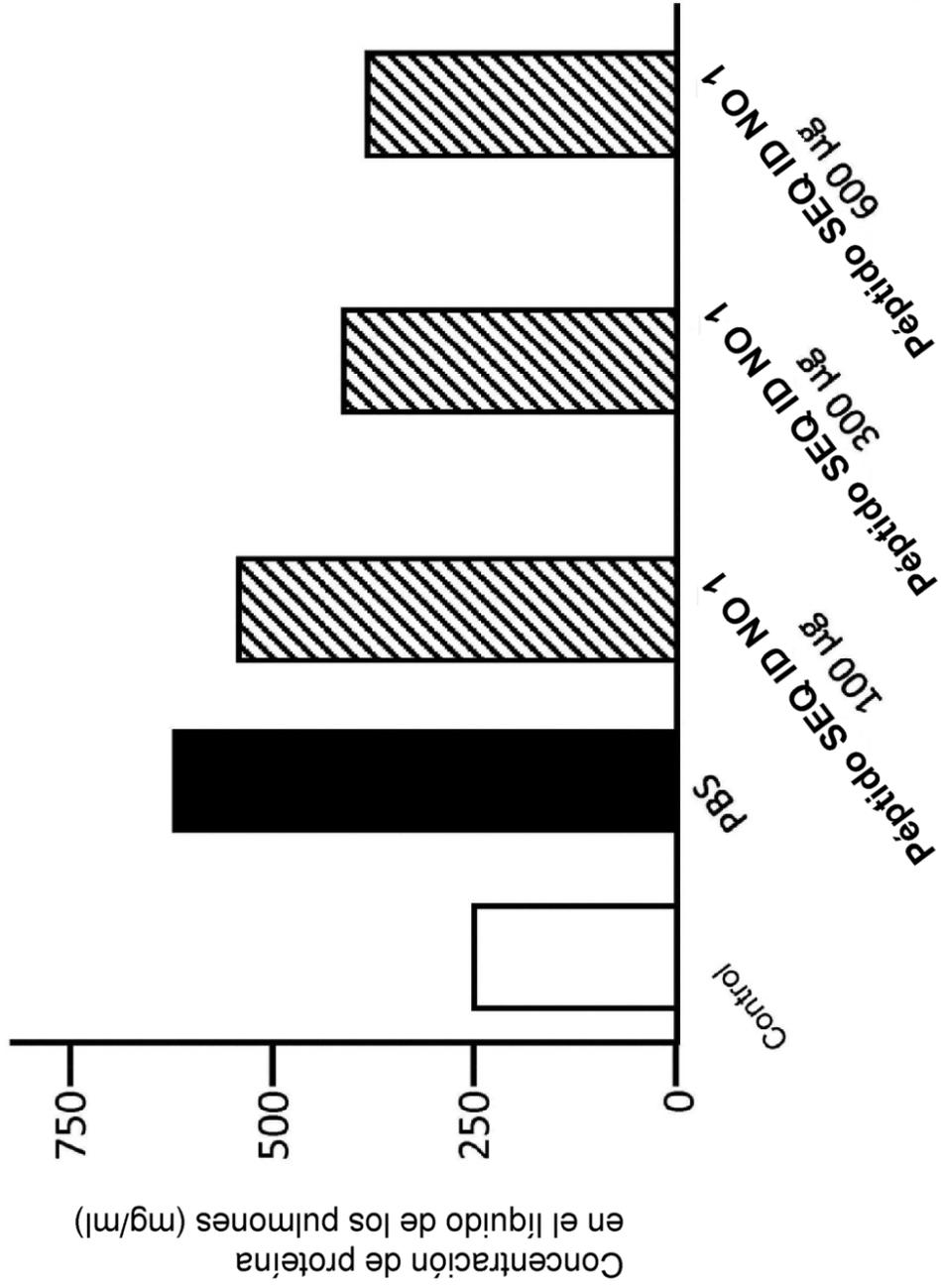


Fig. 2

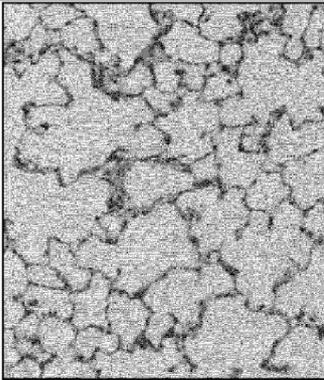
Control		Péptido SEQ ID NO 1 100 µg
PBS		Péptido SEQ ID NO 1 300 µg
		Péptido SEQ ID NO 1 600 µg

Fig. 3

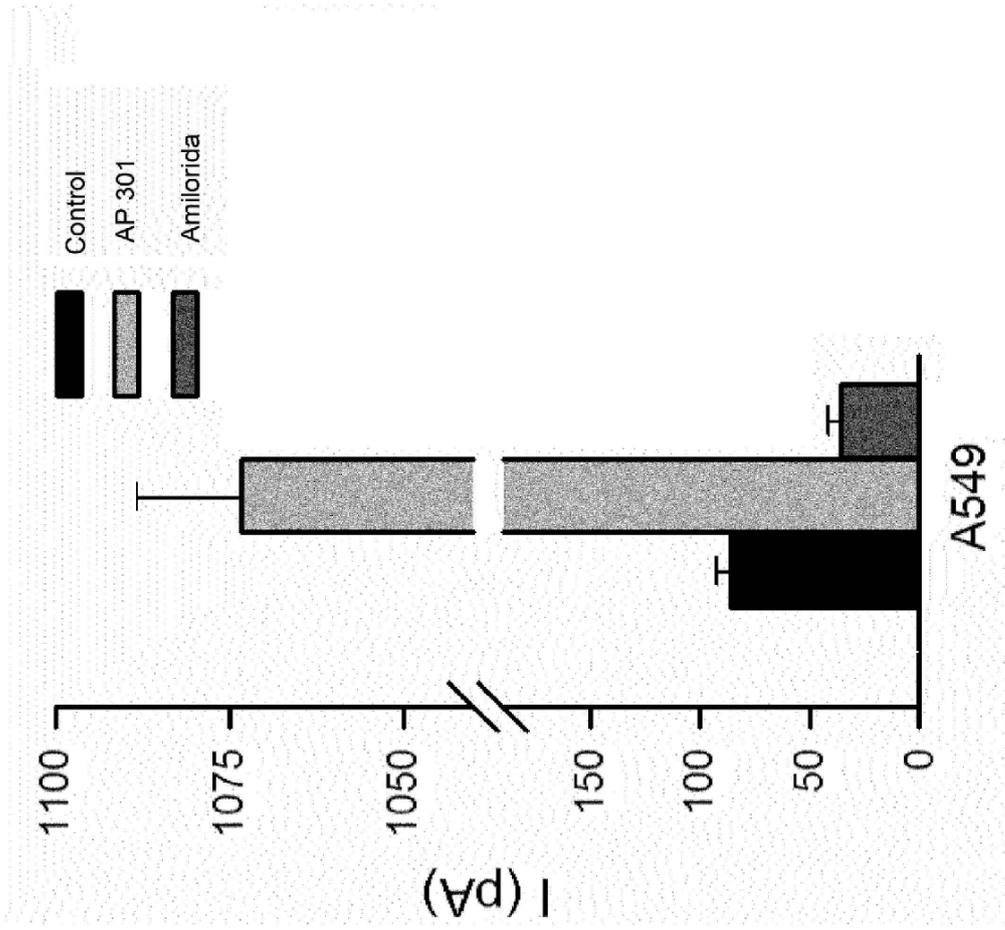


Fig. 4

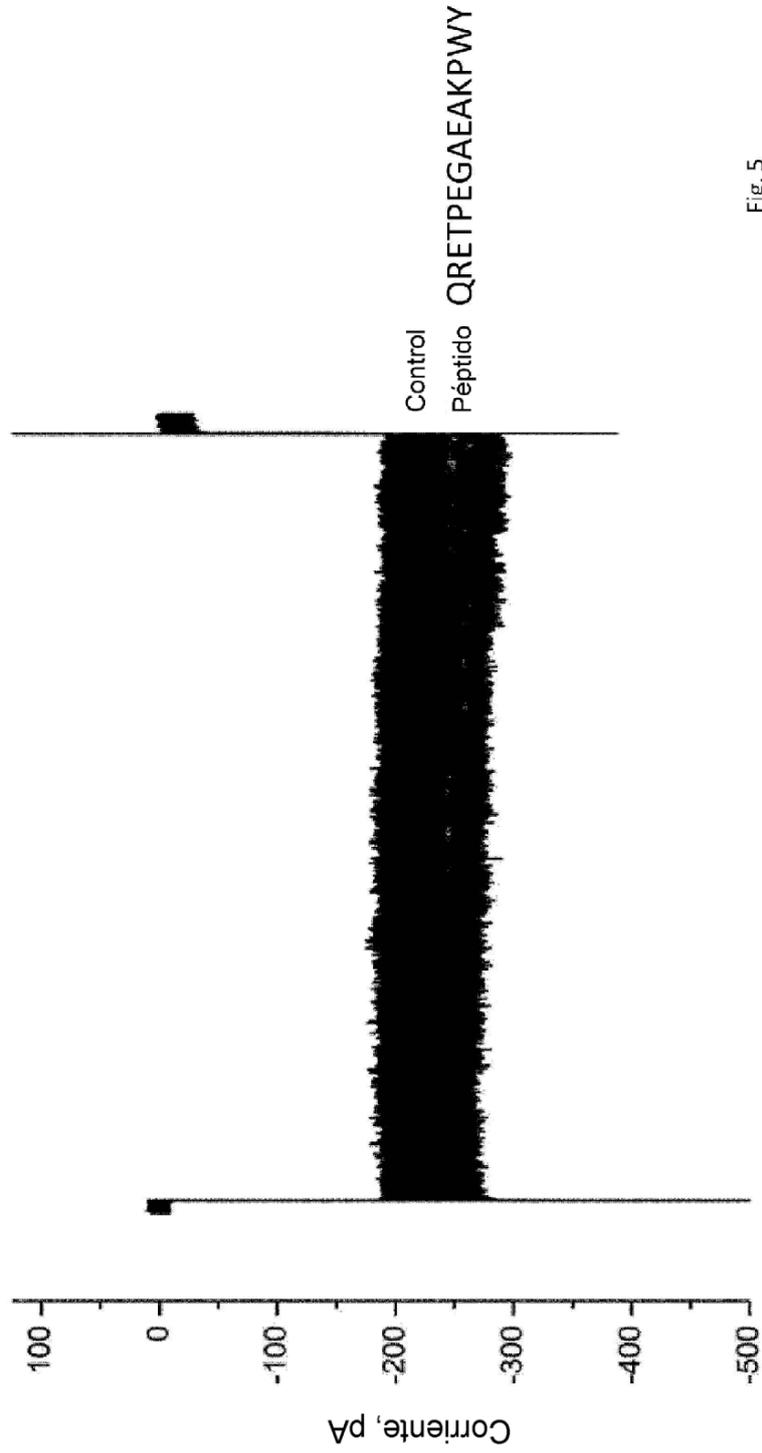


Fig. 5

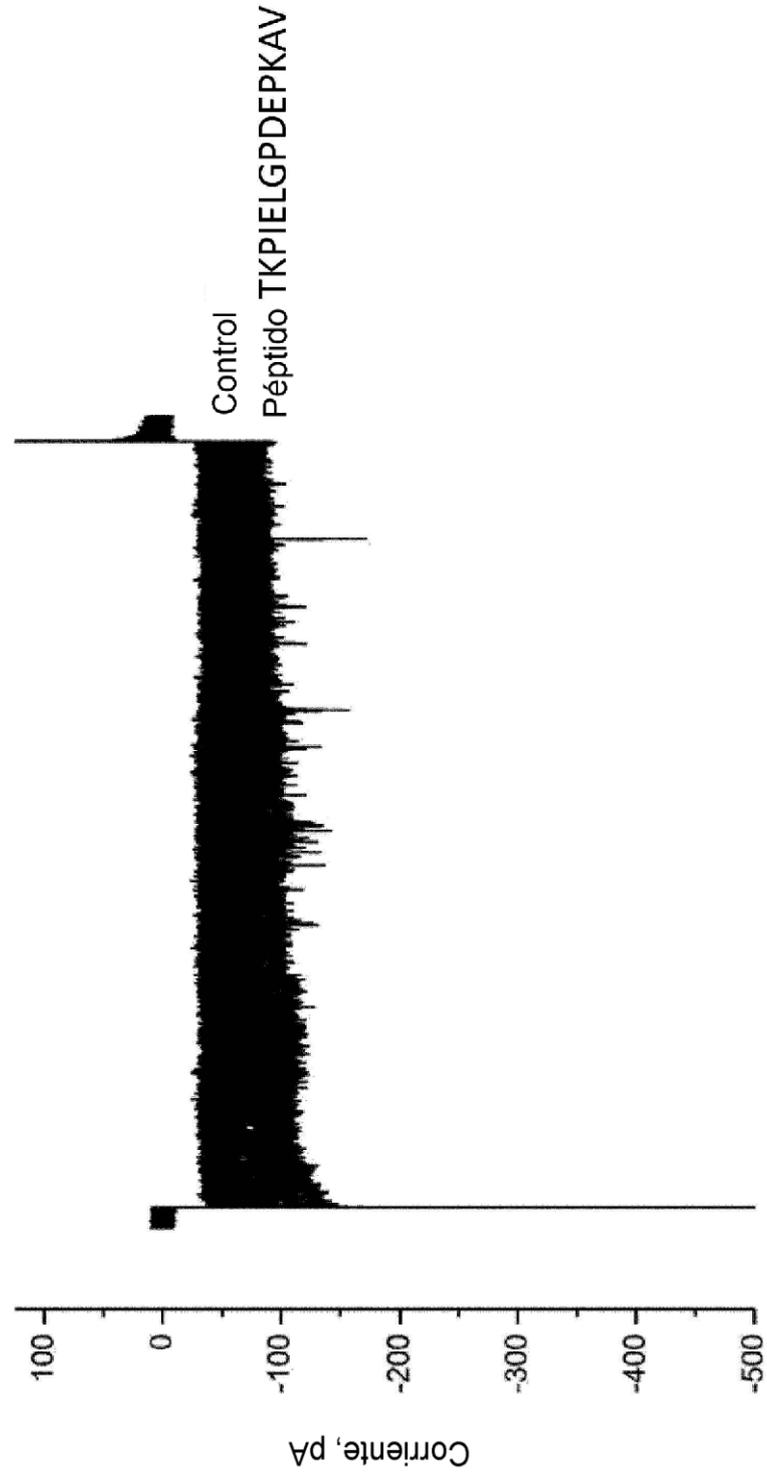


Fig. 6

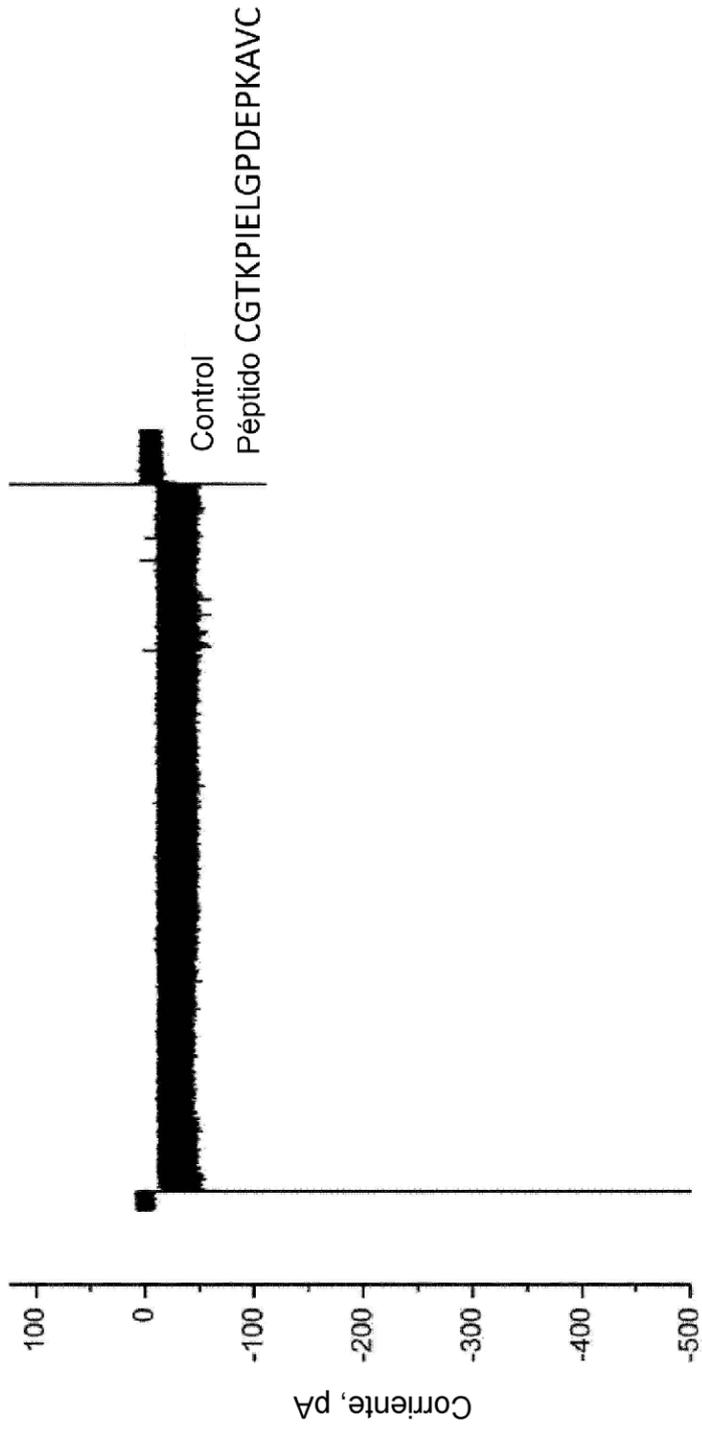


Fig. 7

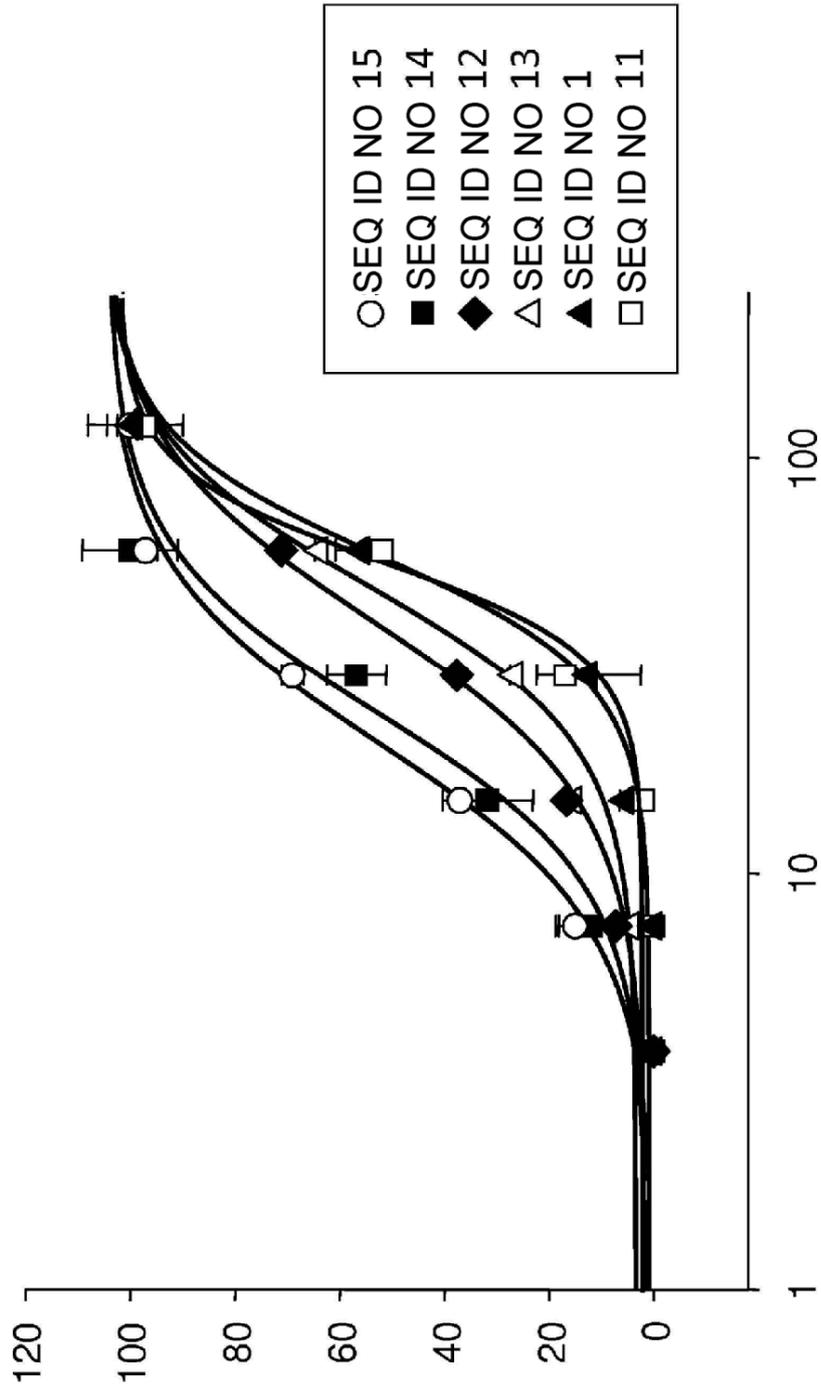


Fig. 8