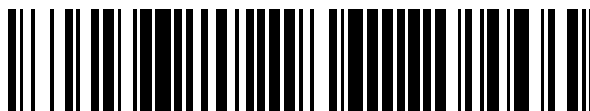


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 667**

51 Int. Cl.:

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.08.2012** **PCT/IB2012/002172**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.03.2013** **WO13030673**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.08.2012** **E 12828087 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** **EP 2750687**

54 Título: **Péptidos anfifílicos para la oclusión del escape de aire torácico**

30 Prioridad:

02.09.2011 US 201161530695 P

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

08.02.2018

73 Titular/es:

3-D MATRIX, LTD. (100.0%)
3-2-4, Kojimachi
Chiyoda-kuTokyo 102-0083, JP

72 Inventor/es:

KOBAYASHI, SATORU;
OKADA, SATOSHI y
TAKAMURA, KENTARO

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 653 667 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos anfifílicos para la oclusión del escape de aire torácico

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un agente para ocluir el escape de aire del pulmón, que comprende un hidrogel de péptido de autoensamblaje.

10 Antecedentes de la invención

Los escapes de aire del pulmón debidos a trauma torácico y a cirugía pulmonar, cáncer de pulmón y pitorax, permanecen como problemas clínicos desafiantes. Las cirugías de pulmón incluyen cirugías abiertas, cirugías toracoscópicas y cirugías broncoscópicas. Las cirugías de pulmón también incluyen los trasplantes de pulmón. Durante y después de la cirugía del pulmón a menudo se escapa aire por los sitios de sutura, en las superficies reseca-
15 dos de los pulmones, en los sitios de anastomosis bronquial y en los sitios de broncorrafia (sutura de una herida en un bronquio). Tales escapes de aire causan el colapso de los pulmones (neumotórax) y empiema.

Tradicionalmente, los escapes de aire del pulmón se han tratado con la inserción, a través de la pared torácica, de tubos torácicos a través de los cuales se aplica vacío para mantener el volumen pulmonar hasta que se haya sellado el escape de aire. Más recientemente se han desarrollado productos y se han usado en el tratamiento de los escapes de
20 aire del pulmón. Estos productos incluyen celulosa oxidada, ácido poliglicólico y pegamentos de fibrina. Tales productos típicamente se aplican directamente al sitio o a los sitios de escape de aire.

Los productos existentes para el tratamiento de los escapes de aire de los pulmones tienen ciertas desventajas. Por ejemplo, el pegamento de fibrina, que consiste en una sustancia biológica, presenta riesgo de infección. Además, el pegamento de fibrina frecuentemente se solidifica durante su aplicación, de manera que se limita su eficacia y facilidad de uso. Se ha encontrado que tanto la celulosa oxidada como el ácido poliglicólico tienen solamente una eficacia limitada.
25

Los documentos núm. US 2011/0002880 y US 2011/0201541 describen ciertos péptidos de autoensamblaje, útiles para la cicatrización de las heridas, reconstrucción de la piel, y oclusión de los tejidos, para evitar el escape de los fluidos corporales (por ejemplo, para lograr hemostasis).
30

35 Resumen de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones. Los presentes inventores han completado esta invención al encontrar que cuando se aplica un hidrogel de péptido de autoensamblaje, empleado como soporte para cultivo celular, en la oclusión del escape de aire del pulmón, se observa un efecto ocluyente equivalente o mayor que el de los agentes ocluyentes existentes.
40

Específicamente, la descripción que comprende la invención se refiere a un agente ocluyente del escape de aire del pulmón, que contiene un péptido, en donde el péptido es anfifílico y tiene de 8-200 residuos de aminoácidos con los aminoácidos hidrófilos e hidrófobos unidos alternativamente, y es un péptido de autoensamblaje que tiene una estructura en lámina beta en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o en presencia de un catión.
45

En una modalidad, el péptido tiene una longitud de 16 residuos de aminoácidos. En un caso, el péptido comprende una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD). En un caso, el péptido consiste esencialmente en una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD). En un caso, el péptido es una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD).
50

En un caso, el péptido comprende una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA). En un caso, el péptido consiste esencialmente en una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA). En un caso, el péptido es una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA).
55

En un caso, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos Ac-(RADA)₄-CONH₂ (SEQ ID NO:1), Ac-(IEIK)₃I-CONH₂ (SEQ ID NO:2), o Ac-(KLDL)₃-CONH₂ (SEQ ID NO:3).
60

En un caso, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos (RAD)₅R (SEQ ID NO:4), (ADR)₅A (SEQ ID NO:5), o (DRA)₅D (SEQ ID NO:6).
65

En un caso, se proporciona el péptido como una solución acuosa de 0.5 % a 2.5 % (peso del péptido con respecto al volumen).

Un aspecto es el péptido anterior para usar en un método para ocluir los escapes de aire del pulmón. El método incluye una etapa de aplicación al sitio del escape de aire del pulmón, de una cantidad efectiva del péptido anfifílico que tiene

de 8-200 residuos de aminoácidos, con los aminoácidos hidrófilos e hidrófobos unidos alternativamente, que es un péptido de autoensamblaje que presenta una estructura en lámina beta en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o en presencia de un catión.

5 En una modalidad, el péptido tiene una longitud de 16 residuos de aminoácidos.

En un caso, el péptido comprende una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD). En un caso, el péptido consiste esencialmente en una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD). En un caso, el péptido es una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico (RAD).

10

En un caso, el péptido comprende una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA). En un caso, el péptido consiste esencialmente en una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA). En un caso, el péptido es una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA).

15

En un caso, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos Ac-(RADA)₄-CONH₂ (SEQ ID NO:1), Ac-(IEIK)₃-CONH₂ (SEQ ID NO:2), o Ac-(KLDL)₃-CONH₂ (SEQ ID NO:3).

En un caso, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos (RAD)₅R (SEQ ID NO:4), (ADR)₅A (SEQ ID NO:5), o (DRA)₅D (SEQ ID NO:6).

20

En un caso, el péptido se proporciona en una solución acuosa de aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 3 % (peso del péptido con respecto al volumen).

En una modalidad, el péptido se aplica a los pulmones.

25

En una modalidad, el péptido se aplica a un bronquio.

En una modalidad, el péptido se aplica toracoscópicamente.

30

En una modalidad, el péptido se aplica broncoscópicamente.

En ciertas modalidades, el agente ocluyente del escape de aire del pulmón también incluye al menos una pequeña molécula de fármaco útil para tratar la enfermedad, a seleccionar entre cáncer, inflamación e infección.

35

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es un grupo de tres Rayos-X de un mini cerdo, las cuales se obtuvieron antes (izquierda), inmediatamente después (centro), y 10 días después del tratamiento de un escape de aire del pulmón creado quirúrgicamente, con un péptido de autoensamblaje en forma de hidrogel de la invención.

40

La Figura 2 es un par de microfotografías que representan la apariencia histopatológica del tejido pulmonar con un pinchazo creado quirúrgicamente y la oclusión mediante el uso del hidrogel de péptido de autoensamblaje. La imagen de la derecha es un detalle de la porción circulada en la imagen de la izquierda. El hidrogel del péptido de autoensamblaje se indica mediante un círculo en la imagen de la derecha.

45

Descripción detallada de la invención

Los péptidos de autoensamblaje tienen una propiedad de manera que las moléculas del péptido forman autoensamblajes que se disponen regularmente de acuerdo con sus secuencias de aminoácidos. En años recientes, estos han atraído mucho la atención como materiales originales debido a sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

50

Los péptidos de autoensamblaje de la invención tienen una estructura alternante de los aminoácidos hidrófilos eléctricamente cargados y los aminoácidos hidrófobos eléctricamente neutrales, y una distribución alternante de las cargas positivas y negativas, de manera que ellos adoptan una estructura en lámina beta en condiciones fisiológicas de pH y concentración salina.

55

Los aminoácidos hidrófilos que se pueden usar incluyen los aminoácidos ácidos tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico, y los aminoácidos básicos tales como arginina, lisina, histidina y ornitina.

60

Los aminoácidos hidrófobos que se pueden usar son: alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina o glicina.

El autoensamblaje de dichos péptidos ocurre bajo las siguientes condiciones.

(1) Las moléculas del péptido adoptan una estructura en lámina beta en solución acuosa, en donde los aminoácidos hidrófilos cargados y los aminoácidos hidrófobos eléctricamente neutros están mal distribuidos a los dos lados de las moléculas del péptido.

(2) La estructura en lámina beta resulta en una distribución eléctrica complementaria entre las moléculas adyacentes.

(3) La estructura en lámina beta conduce a uniones suficientemente hidrofóbicas entre las moléculas adyacentes.

(4) La carga eléctrica de las cadenas laterales de aminoácidos está protegida por sales inorgánicas monovalentes.

(5) Las moléculas son electrostáticamente neutras cerca del punto isoelectrico del péptido.

Se cree que el autoensamblaje ocurre mediante el siguiente mecanismo, cuando se satisfacen todas estas condiciones.

(1) La distribución alternante de la carga positiva y la carga negativa en las moléculas del péptido causan atracción entre las moléculas.

(2) Las uniones hidrofóbicas se forman entre las cadenas laterales de aminoácidos neutrales de las moléculas adyacentes.

(3) La distribución eléctrica positiva/negativa resulta en una alineación complementaria entre las moléculas adyacentes, y la fuerza asociativa entre las moléculas se fortalece.

(4) Los agregados moleculares se extienden gradualmente y forman nanofibras.

Las nanofibras son fibras superfina con grosores de aproximadamente 10 nm a 20 nm, y ellas se agregan para formar una malla y macroscópicamente exhiben una forma tipo gel.

La red de la estructura del gel se parece mucho a la matriz extracelular natural (ECM) en cuanto a los tamaños de las fibras y los tamaños de los poros, y está en estudio su uso como soporte de superficie plana para cultivo celular.

Como el hidrogel de péptido es biodegradable y sus productos de descomposición no tienen efectos adversos sobre el tejido, mientras que también es altamente bioabsorbible, es adecuado para el injerto celular y el crecimiento.

Como los péptidos de autoensamblaje son productos químicos sintéticos, y no productos aislados de fuentes biológicas, ellos no conllevan el riesgo de enfermedad infecciosa de los productos derivados de animales, lo cual incluye virus animales y otros agentes infecciosos tales como el agente de la enfermedad de las vacas locas (encefalopatía espongiforme bovina, BSE).

En este agente ocluyente del escape de aire del pulmón, el péptido es preferiblemente un péptido de autoensamblaje que contiene una secuencia repetida de arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA); una secuencia repetida de isoleucina-ácido glutámico-isoleucina-lisina (IEIK); o una secuencia repetida de lisina-leucina-ácido aspártico-leucina (KLDL). En una modalidad, es un péptido de autoensamblaje que comprende la secuencia de aminoácidos Ac-(RADA)₄-CONH₂ (SEQ ID NO:1). En un caso, es un péptido de autoensamblaje que comprende la secuencia de aminoácidos Ac-(IEIK)₃-CONH₂ (SEQ ID NO:2). En un caso, es un péptido de autoensamblaje que comprende la secuencia de aminoácidos Ac-(KLDL)₃-CONH₂ (SEQ ID NO:3).

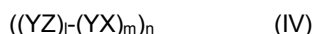
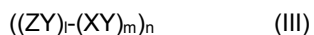
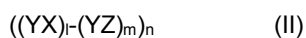
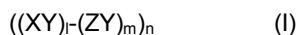
El agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la invención se explicará ahora en detalle.

El componente principal del agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la descripción que comprende la invención es un péptido de autoensamblaje que es un péptido anfifílico que tiene 8-200 residuos de aminoácidos, con los aminoácidos hidrófilos y los aminoácidos hidrófobos unidos alternativamente, y que presenta una estructura en lámina beta en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o un catión.

De acuerdo con la invención, el pH fisiológico es pH 6-8, preferiblemente pH 6.5-7.5 y con mayor preferencia pH 7.3-7.5.

Un "catión" como se usa en el presente documento es un ion cargado positivamente, por ejemplo, el ion sodio (Na⁺) o el ion potasio (K⁺). En un caso, el catión está presente a una concentración de aproximadamente 5 mM a 5 M. Un catión puede ser un catión simple o una combinación de cationes.

Los péptidos de autoensamblaje que se usan para la descripción se pueden representar por las siguientes cuatro fórmulas.



En las fórmulas (I)-(IV), X representa un aminoácido ácido, Y representa un aminoácido hidrófobo, Z representa un aminoácido básico, y l, m, y n son todos enteros, en donde $n \times (l + m) < 200$.

Por supuesto, no se requiere que un péptido de la invención empiece y termine con una unidad repetitiva completa. Esto es, solamente una porción de cualquier unidad repetitiva dada, puede estar presente en uno cualquiera o en los dos extremos del péptido de la invención. Por ejemplo, un péptido formado primariamente por unidades repetitivas de RADA puede empezar con N-terminal A, DA, o ADA; igualmente, un péptido formado primariamente por unidades repetitivas de RADA puede terminar en C-terminal R, RA, o RAD.

Los N-terminales pueden ser acetilados, y los C-terminales pueden ser amidados.

Los aminoácidos hidrófilos que se pueden usar incluyen aminoácidos ácidos tales como el ácido aspártico y el ácido glutámico, y aminoácidos básicos tales como arginina, lisina, histidina y ornitina. Como aminoácidos hidrófobos se pueden usar alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptofano, serina, treonina o glicina.

Entre estos péptidos de autoensamblaje, se prefieren los péptidos de autoensamblaje que tienen las secuencias repetidas arginina-alanina-ácido aspártico-alanina (RADA), y tales secuencias peptídicas se representan por $\text{Ac-(RADA)}_p\text{-CONH}_2$ ($p=2-50$) (SEQ ID NO:7). También se prefieren los péptidos de autoensamblaje que tienen la secuencia repetida isoleucina-ácido glutámico-isoleucina-lisina (IEIK), y dichas secuencias peptídicas se representan por $\text{Ac-(IEIK)}_p\text{-CONH}_2$ ($p=2-50$) (SEQ ID NO:8). Hay otros péptidos de autoensamblaje que también se prefieren, los cuales tienen secuencias repetidas de lisina-leucina-ácido aspártico-leucina (KLDL), y dichas secuencias peptídicas se representan por $\text{Ac-(KLDL)}_p\text{-CONH}_2$ ($p=2-50$) (SEQ ID NO:9). Estos péptidos de autoensamblaje pueden estar compuestos por 8-20 residuos de aminoácidos, preferentemente por 8-32 residuos de péptidos de autoensamblaje y más preferentemente por 12-16 residuos. En una modalidad, el péptido tiene una longitud de 16 residuos de aminoácidos.

Como ejemplos de péptidos específicos de autoensamblaje de acuerdo con esta descripción, se puede mencionar el péptido RAD16-I que tiene la secuencia $\text{Ac-(RADA)}_4\text{-CONH}_2$ (SEQ ID NO:1), el péptido IEIK13 que tiene la secuencia $\text{Ax-(IEIK)}_3\text{-CONH}_2$ (SEQ ID NO:2), y el péptido KLD que tiene la secuencia $\text{Ac-(KLDL)}_3\text{-CONH}_2$ (SEQ ID NO:3). Una solución acuosa al 1 % de RAD6-I está disponible como el producto PuraMatrix™ por 3D-Matrix Co., Ltd. PuraMatrix™ contiene 1 % del péptido que tiene la secuencia $\text{Ac-(RADA)}_4\text{-CONH}_2$ (SEQ ID NO:1), con ion hidrógeno e ion cloruro.

En un caso, el péptido tiene la secuencia de aminoácidos $(\text{RAD})_5\text{R}$ (SEQ ID NO:4), $(\text{ADR})_5\text{A}$ (SEQ ID NO:5), o $(\text{DRA})_5\text{D}$ (SEQ ID NO:6). Los N-terminales pueden ser acetilados, y los C-terminales pueden ser amidados, similar a SEQ ID NOS:1-3.

De acuerdo con la invención, los péptidos se pueden preparar mediante el uso de métodos y equipamiento estándar de preparación de péptidos sintéticos, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos automático programable. Los sintetizadores de péptidos y los reactivos para usar con los mismos están fácilmente disponibles en varios proveedores comerciales, por ejemplo, Applied Biosystems.

PuraMatrix™, IEIK13, y KLD son oligopéptidos de 12-16 residuos de aminoácidos que tienen una longitud de aproximadamente 5 nm. Aunque sus soluciones son líquidas en pH ácido, a una concentración de al menos aproximadamente 0.1 % (peso/volumen) los péptidos sufren autoorganización ante el cambio a pH neutral, con la formación de nanofibras de aproximadamente 10 nm de diámetro, lo cual causa gelificación de las soluciones del péptido.

PuraMatrix™ es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de arginina cargada positivamente y ácido aspártico cargado negativamente como aminoácidos hidrófilos, y alanina como aminoácido hidrófobo. IEIK13 es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de lisina cargada positivamente y ácido glutámico cargado negativamente como aminoácidos hidrófilos, e isoleucina como aminoácido hidrófobo. KLD es un péptido anfifílico que tiene una secuencia de aminoácidos con repeticiones alternas de lisina cargada positivamente y ácido aspártico cargado negativamente como aminoácidos hidrófilos, y leucina como aminoácido hidrófobo. El autoensamblaje de estos péptidos se debe a las uniones de hidrógeno y a las uniones hidrofóbicas entre las moléculas del péptido por los aminoácidos que componen los péptidos.

En los péptidos de autoensamblaje que se usan para la invención, el diámetro de las nanofibras es 10-20 nm y el tamaño de los poros es 5-200 nm, como promedios. Estos intervalos de valores numéricos son aproximadamente los mismos que el colágeno, que es la matriz extracelular natural.

El pH fisiológico y la concentración de sales son las condiciones para el autoensamblaje de los péptidos de la invención. La presencia de un ion metálico alcalino monovalente promueve la gelificación. Una vez que ha ocurrido la gelificación, el gel no se descompone, ni siquiera bajo condiciones comunes de desnaturalización de proteínas, tales como la exposición a alta temperatura o a agentes desnaturalizantes tales como ácidos, álcalis, proteasas, urea, hidrócloruro de guanidina, o semejantes.

- Estos péptidos de autoensamblaje, tales como PuraMatrix™, son secuencias de péptidos que carecen de un motivo fisiológicamente activo bien definido, y por tanto la función celular intrínseca no se afecta. Los motivos fisiológicamente activos controlan numerosos fenómenos intracelulares, tales como la transcripción, y la presencia de motivos fisiológicamente activos puede conducir a la fosforilación de proteínas intracitoplasmáticas o superficiales mediante enzimas que reconocen esos motivos. Cuando está presente un motivo fisiológicamente activo en un agente peptídico, se pueden activar o suprimir proteínas de transcripción con varias funciones. Los péptidos de autoensamblaje, tales como PuraMatrix™, carecen de tales motivos fisiológicamente activos y por tanto no conllevan este riesgo.
- Además, un péptido de autoensamblaje compuesto de aminoácidos naturales también tiene biocompatibilidad y biodegradabilidad satisfactoria, y se ha reportado que una infusión de PuraMatrix™ en el músculo cardíaco murino, por ejemplo, resulta en infiltración de células hacia la PuraMatrix™ y formación de tejido normal. Los tiempos de descomposición difieren en dependencia de las condiciones, tales como el lugar de la infusión, pero las fibras se descomponen y se excretan al cabo de 2 a 8 semanas después de la infusión.
- El agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la invención también puede contener una o más moléculas pequeñas de fármacos. Como se usa en el presente documento, una molécula pequeña de fármaco es una molécula orgánica de hasta 1 kDa de peso molecular y que tiene actividad farmacéutica.
- No hay restricciones particulares para tales moléculas pequeñas de fármacos, y estas pueden incluir, sin limitación, glucosa, sacarosa, sacarosa purificada, lactosa, maltosa, trealosa, dextrano, yodo, cloruro de lisozima, dimetil isopropil azuleno, tocoferol tretionina, yodo povidona, alprostadil alfadex, alcohol anisado, salicilato de isoamilo, alfa dimetil feniletil alcohol, bacdanol, helional, sulfazina de plata, bucladesina de sodio, alprostadil alfadex, sulfato de gentamicina, hidroclicloruro de tetraciclina, fusidato de sodio, hidrato de mupirocina de calcio y benzoato de isoamilo.
- La molécula pequeña de fármaco puede ser un agente anticáncer. Como se usa en el presente documento, un agente anticáncer se refiere a un agente quimioterapéutico u otra molécula pequeña de radionúclido útil para matar células cancerígenas. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen Ácido Retinoico 13-cis, 2-Clorodeoxiadenosina, 5-Azaciditidina, 5-Fluorouracilo, (5-FU), 6-Mercaptopurina, (6-MP), 6-Tioguanina (6-TG), Abraxane, Accutane®, Actinomycina-D, Adriamycin®, Adrucil®, Afinitor®, Agrylin®, Ala-Cort®, Aldesleukin, ALIMTA, Alitretinoin, Alkaban-AQ®, Alkeran®, Acido All-Transretinoico, Altretamine, Ametopterin, Amifostine, Aminoglutetimide, Anagrelide, Anandron®, Anastrozole, Arabinosilcitosine, Ara C, Aranesp®, Aredia®, Arimidex®, Aromasin®, Arranon®, Trióxido de Arsénico, Arzerra™, Asparaginase, ATRA, Avastin®, Azacitidine, BCG, BCNU, Bendamustine, Bexarotene, BEXXAR®, Bicalutamide, BiCNU, Bleomixane®, Bleomicin, Busulfan, Busulfex®, C225, Leucovorin de Calcio, Campptosar®, Camptotecin-11, Capecitabine, Carac™, Carboplatin, Carmustine, Carmustine Wafer, Casodex®, CC-5013, CC1-779, CCNU, CDDP, CeeNU, Cerubidine®, Chlorambucil, Cisplatin, Citrovorum Factor, Cladribine, Cortisona, Cosmegen®, CPT-11, Ciclofosfamida, Cytaclad®, Cytarabine, Cytarabine Liposomal, Cytosar-U®, Cytoxan®, Dacarbazine, Dacogen, Dactinomycin, Darbepoetin Alfa, Dasatinib, Daunomycin, Daunorubicin, Hidroclicloruro de Daunorubicin, Daunorubicin Liposomal, DaunoXome®, Decadron, Decitabine, Delta-Cortef®, Deltasone®, Denileukin, Diftitox, DepoCyt™, Dexametasona, Acetato de Dexametasona, Fosfato sódico de Dexametasona, Dexasone, Dexrazoxane, DHAD, DIC, Diodex, Docetaxel, Doxil®, Doxorubicin, Doxorubicin Liposomal, Droxia™, DTIC, DTIC-Dome®, Duralone®, Efudex®, Eligard™, Ellence™, Eloxatin™, Elspar®, Emcyt®, Epirubicin, Erbitux, Erlotinib, Erwinia, L-asparaginasa, Estramustine, Etiole, Etopophos®, Etoposide, Etoposide Phosphate, Eulexin®, Everolimus, Evista®, Exemestane, Fareston®, Faslodex®, Femara®, Filgrastim, Floxuridine, Fludara®, Fludarabine, Fluoroplex®, Fluorouracil, Fluoximesterone, Flutamide, Ácido Folínico, FUDR®, Fulvestrant, Gefitinib, Gemcitabine, Gemzar, Gleevec™, Gliadel® Wafer, Goserelin, Halotestin®, Herceptin®, Hexadrol, Hexalen®, Hexametilmelamina (HMM), Hycamtin®, Hydrea®, Acetato de Hidrocortisona, Hidrocortisona, Fosfato sódico de Hidrocortisona, Succinato sódico de Hidrocortisona, Fosfato de Hidrocortisona, Hidroxiurea, Tiuxetan, Idamycin®, Idarubicin, Ifex®, Ifosfamide, Imatinib mesylate, Imidazole Carboxamide, Intron A®, Iressa®, Irinotecan, Isotretinoin, Ixabepilone, Ixempra™, Kidrolase (t), Lanacort®, L-asparaginase, LCR, Lenalidomide, Letrozole, Leucovorin, Leukeran, Leukine™, Leuprolide, Leurocristine, Leustatin™, Liposomal Ara-C, Liquid Pred®, Lomustine, L-PAM, L-Sarcolisin, Lupron®, Lupron Depot®, Matulane®, Maxidex, Mecloretamine, Hidroclicloruro de Mecloretamine, Medrolone®, Medrol®, Megace®, Megestrol, Megestrol Acetate, Melphalan, Mercaptopurine, Mesna, Mesnex™, Metotrexate, Methotrexate Sodium, Methylprednisolone, Meticorten®, Mitomicin, Mitomicin-C, Mitoxantrone, M-Prednisol®, MTC, MTX, Mustargen®, Mustine, Mutamicin®, Myleran®, Mylocel™, Mylotarg®, Navelbine®, Nelarabine, Neosar®, Neulasta™, Neumega®, Neupogen®, Nexavar®, Nilandron®, Nilotinib, Nilutamide, Nipent®, Mostaza de Nitrógeno, Novaldex®, Novantrone®, Nplate, Octreotide, Acetato de Octreotide, Oncospar®, Oncovin®, Ontak®, Onxal™, Oprelvekin, Orapred®, Orasone®, Oxaliplatin, Paclitaxel, Pamidronate, Panretin®, Paraplatin®, Pazopanib, Pediaapred®, Pegaspargase, Pegfilgrastim, PEG-L-asparaginasa, PEMETREXED, Pentostatin, Mostaza de Fenilalanina, Platinol-AQ®, Prednisolona, Prednisona, Prelone®, Procarbazine, Prolifeprosan 20 con Implante de Carmustine, Purinethol®, Raloxifene, Revlimid®, Reumatrex®, Romiplostim, Rubex®, Hidroclicloruro de Rubidomycin, Sandostatin®, Sandostatin LAR®, Sargramostim, Solu-Cortef®, Solu-Medrol®, Sorafenib, SPRYCEL™, STI-571, Streptozocin, SU11248, Sunitinib, Sutent®, Tamoxifen, Tarceva®, Targretin®, Tassigna®, Taxol®, Taxotere®, Temodar®, Temozolomide, Temsirolimus, Teniposide, TESPAs, Talidomide, Thalomid®, TheraCys®, Tioguanina, Thioguanine Tabloid®, Thiofosfoamida, Thioplex®, Thiotepa, TICE®, Toposar®, Topotecan, Toremfene, Torisel®, Treanda®, Tretinoin, Trexall™, Trisenox®, TSPA, TYKERB®, VCR, Vectibix™, Velban®, Velcade®, VePesid®, Vesanoide®, Viadur™, Vidaza®, Vinblastine, Sulfato de Vinblastina, Vincasar Pfs®, Vincristine, Vinorelbine, Tartrato de

Vinorelbine, VLB, VM-26, Vorinostat, Votrient, VP-16, Vumon®, Xeloda®, Zanosar®, Zevalin™, Zinecard®, Zoladex®, Ácido Zoledronico, Zolinza, y Zometa®.

5 La molécula pequeña de fármaco puede ser un agente antiinflamatorio. Los agentes antiinflamatorios incluyen corticoesteroides (por ejemplo, prednisona, cortisona, metilprednisolona) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs) (por ejemplo, aspirina, celecoxib, diclofenaco sódico, flurbiprofeno, fenoprofeno de calcio, ibuprofeno, indometacina, ketoprofeno, naproxeno, oxaprozin, piroxicam, rofecoxib, sulindac, tolmetina sódica, y valdecoxib).

10 La molécula pequeña de fármaco puede ser un agente antiinfeccioso. Los agentes antiinfecciosos incluyen antibióticos antibacteriales, antivirales, y antifúngicos, y parasiticidas.

15 Se puede añadir un azúcar al agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la invención, para mejorar la presión osmótica de la solución desde la hipotonicidad a la isotonicidad, sin reducir el efecto ocluyente del escape de aire del pulmón; de esta manera se permite que aumente la seguridad biológica.

20 El agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la invención puede estar en forma de polvo, de solución, de gel, o similares. Como el péptido de autoensamblaje gelifica en respuesta a los cambios de pH y de la concentración de sal de la solución, se puede distribuir como un fármaco líquido que gelifica al contacto, o en breve después del contacto con el cuerpo durante la aplicación.

25 Las formulaciones para uso clínico pueden incluir jeringuillas equipadas con cilindros o pipetas que estén prellenadas con la solución química que contiene los componentes, tales como los péptidos de autoensamblaje (jeringuillas prellenadas), o métodos de suministrar una solución química con los componentes a una jeringuilla o a la punta de una pipeta a través de la abertura de la jeringuilla o de la punta de la pipeta (un aspirador o válvula), y aplicarlo al área afectada a través de la sección de descarga. A veces se usa una construcción con dos o más jeringuillas o pipetas.

Los componentes se pueden usar como un recubrimiento en un instrumento tal como un stent o catéter, para suprimir el escape de gas del pulmón.

30 Los componentes también se pueden anclar en un soporte tal como gasa o un vendaje, o un forro, que se usa comúnmente en este campo. Los componentes también se pueden empapar en una esponja para su uso.

35 Además, se puede preparar un atomizador relleno con un polvo o la solución de los componentes. Cuando se usa esta aspersión sobre un área afectada, el pH y la concentración de sales aumenta con el contacto con el cuerpo, de manera que se produce gelificación, y por tanto esta forma se puede aplicar a una gran variedad de sitios y condiciones.

40 Un aspecto de la invención se refiere a un método para tratar el escape de aire del pulmón. El método incluye una etapa de aplicación, a un sitio de escape de aire del pulmón, de una cantidad efectiva de un péptido de acuerdo con la invención, es decir, un péptido anfifílico que tiene 8-200 residuos de aminoácidos con los aminoácidos hidrófilos y de aminoácidos hidrófobos unidos alternativamente, y es un péptido de autoensamblaje que exhibe una estructura beta laminar en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o en presencia de un catión.

45 Como se usa en el presente documento, un "escape de aire del pulmón" se refiere a cualquier situación en la cual el aire se escape de manera anormal de las vías aéreas del pulmón, por ejemplo, hacia los espacios extraalveolares. Los escapes de aire del pulmón pueden ocurrir espontáneamente en enfermedades tales como el enfisema, en el cual las burbujas se rompen. Los escapes de aire del pulmón también pueden ocurrir como resultado de un trauma (penetrante o no penetrante) del tórax, así como también por procedimientos quirúrgicos (y complicaciones de los mismos), que involucran los pulmones. En un caso, el escape de aire del pulmón puede presentarse como enfisema pulmonar intersticial, neumomediastino, neumotórax, neumopericardio, neumoperitoneo, enfisema subcutáneo, o cualquier combinación de los mismos. En un caso, el escape de aire del pulmón puede ocurrir en asociación con la biopsia quirúrgica o por resección de tejido pulmonar, por ejemplo, resección de cáncer de pulmón de células pequeñas, tumor carcinoide, cáncer de pulmón de células no pequeñas, adenocarcinoma, o carcinoma de células escamosas.

50 Como se usa en el presente documento "aplicar" es administrar localmente, por ejemplo, por empapamiento, goteo, pintura, aspersión o de cualquier otra manera por contacto con el tejido del sitio a tratar. En un caso, el sitio es el tejido del parénquima pulmonar, por ejemplo, en el sitio de la resección. En un caso, el sitio es la tráquea, bronquio, bronquiolo, u otra vía aérea. En un caso, el sitio es un bronquio.

55 En una modalidad el péptido se aplica toracoscópicamente, es decir, por la vía de un instrumento toracoscópico. Tales instrumentos se conocen bien en la técnica y no es necesario describirlos aquí. En un caso, el péptido se aplica durante la cirugía toracoscópica.

60 En una modalidad, el péptido se aplica broncoscópicamente, es decir, por la vía de un instrumento broncoscópico. Tales instrumentos se conocen bien en la técnica y no es necesario describirlos aquí. En un caso, el péptido se aplica durante la cirugía broncoscópica o durante un procedimiento broncoscópico tal como el examen broncoscópico, la biopsia broncoscópica, el cepillado broncoscópico, o el lavado alveolar broncoscópico.

El péptido se aplica en una cantidad efectiva para tratar el escape de aire del pulmón. Como se usa en el presente documento, el término "tratar" significa reducir, mejorar o curar una enfermedad de un sujeto. Un "sujeto", como se usa en este documento, se refiere a un mamífero, específicamente incluye, pero no se limita al humano.

Una "cantidad efectiva", como se usa en el presente documento, es una cantidad que es suficiente para producir un resultado biológico deseado. Los expertos en la técnica no tendrán dificultad para determinar con precisión lo que constituye una cantidad efectiva, basado en estudios convencionales con animales (tal como se describe más abajo) y/o la experiencia clínica. Una cantidad efectiva puede variar en dependencia de la lesión particular a tratar. Por ejemplo, una cantidad efectiva puede variar en dependencia de factores tales como el sitio de la lesión, el tamaño de la lesión, la enfermedad del sujeto, y otros factores de fácil reconocimiento por los médicos expertos habituales.

En un caso, el péptido se puede proporcionar como una solución acuosa, en un caso la solución acuosa del péptido es aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 3 % (peso/volumen). El solvente para la solución acuosa puede ser agua sola, dextrosa fisiológicamente isotónica (por ejemplo, 5 % de dextrosa en agua), solución salina fisiológica, solución Ringer, o semejantes. La invención también acepta otros solventes acuosos fisiológicamente aceptables.

Un aspecto de la descripción que comprende la invención es una composición farmacéutica que comprende un péptido de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. Se puede hacer una composición farmacéutica mediante la combinación de un péptido de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. En un caso, la composición farmacéutica se esteriliza por cualquier método adecuado, por ejemplo, esterilización por filtrado. En un caso, el portador farmacéuticamente aceptable se selecciona a partir de agua sola y dextrosa fisiológicamente isotónica (por ejemplo, 5 % dextrosa en agua). En un caso, la composición farmacéutica además incluye al menos un agente adicional, por ejemplo, un preservativo, un agente estabilizador, o un agente colorante.

Un aspecto de la descripción es el estuche. El estuche incluye un péptido de la invención, un aplicador e instrucciones para usar el péptido y el aplicador para ocluir el escape de aire del pulmón. En un caso, el péptido de la invención se proporciona como un polvo. En un caso, el péptido de la invención se proporciona como un polvo y el estuche incluye además un solvente acuoso para el péptido. En un caso, el péptido se proporciona como una solución acuosa. En un caso, el aplicador es una esponja. En un caso, el aplicador es un gotero, por ejemplo, con un bulbo deformable y una punta a través de la cual se puede extraer y dispensar la solución del péptido. En un caso, el aplicador se construye y se dispone para dispensar una solución del péptido como una aspersión.

El agente ocluyente del escape de aire del pulmón de la invención se explicará con mayor detalle a través del siguiente ejemplo.

EJEMPLO

Efectos de la solución acuosa 2.5 % del péptido en un modelo en cerdos miniatura

Se usó un modelo de escape de aire del pulmón en cerdos miniatura para determinar si una solución acuosa 2.5 % (peso/volumen) del péptido puede ocluir el escape de aire. Se creó quirúrgicamente un escape de aire en al menos un cerdo miniatura ("mini-pig"). Se aplicó tópicamente al sitio del escape de aire una solución acuosa del péptido de autoensamblaje al 2.5 % de acuerdo con la invención. La evaluación del escape de aire mostró que se ocluyó después de la aplicación de la solución del péptido.

El peso corporal de los cerdos miniatura (Göttingen) al recibirlos estuvo en el intervalo entre 21.4 y 22.6 kg. Los animales permanecieron en cuarentena durante 7 días y se aclimataron durante 2 días. La habitación de los animales se mantuvo a una temperatura de 23 °C, 55 % de humedad, periodos de luz de 12 horas (de 6:00 a 18:00), y 10 cambios completos de ventilación por hora (aire fresco a través del filtro).

Diseño del Estudio

	Número de animales	Número de animal
Grupo de observación	3	M00001, M00002, M00003
Necropsia en cirugía	1	-

Dieta

A los animales se les suministraban 500 g $\pm$ 5 g/día de dieta de gránulos (con no más de 5 meses de fabricada, Nisseiken, Ltd.) mediante el uso de un alimentador de metal en las mañanas.

Agua para beber

El animal tiene acceso libre al agua de beber mediante el uso de un sistema abrevador automático.

Anestesia y tratamiento preoperatorio

- 5 Los animales se anestesiaron mediante el uso de una inyección intramuscular de 0.05 mg/kg de sulfato de atropina y 15 mg/kg de hidrocloreto de ketamina en la cervical posterior. Se insertó una cánula traqueal (PORTEX) bajo anestesia general, proporcionada como N₂O:O₂=1:1 mezcla de gas + 0.5 % de isoflurano mediante el uso de un aparato de inhalación (Vigor21 II, ACOMA Medical Industry Co., Ltd). La respiración artificial se llevó a cabo como sigue: 10-15 mL/kg, 18-22 respiraciones/minuto mediante el uso de un respirador artificial (PRO-V mkII, ACOMA Medical Industry Co., Ltd). Además, se administró por vía intravenosa Ampicilina + solución de Ringer glucosa lactato (1 gota/segundo) desde el preoperatorio hasta el cierre del tórax.

Toracotomía y creación quirúrgica del daño al pulmón

- 15 Los animales que se trataron como se describió anteriormente se colocaron acostados sobre el lado izquierdo y se expuso el pulmón mediante toracotomía desde el lado derecho. Se creó el escape de aire por medio de un pinchazo perpendicular al lóbulo pulmonar mediante el uso de una aguja de inyección 18G (TERUMO Ltd.). La confirmación del escape de aire del pulmón se llevó a cabo con solución salina fisiológica que llenó la cavidad torácica. Entonces, el hidrogel del péptido de autoensamblaje RADA16 al 2.5 % (peso/volumen) se aplicó varias veces, 10-15 mL, hasta que se detuvo el escape de aire. Debido a la dispersión del péptido por la inflación y deflación del pulmón, el péptido de autoensamblaje se aplicó a la lesión con la ayuda de pinzas de agarre para ayudar a localizar el gel en la superficie del pulmón en el sitio de la lesión por el pinchazo. Este procedimiento fue efectivo para ocluir el escape de aire del pulmón.

- 25 La oclusión del escape de aire del pulmón se revisó inicialmente mediante la subida de la presión interna del sistema de respiración artificial. Entonces, la oclusión finalmente se confirmó mediante un aumento gradual de la presión del aire a 20 cm H₂O de la presión interna.

- 30 Se obtuvo una muestra de pulmón de un animal que se sometió a necropsia en la cirugía y se fijó con formalina neutral tamponada al 10 vol % para confirmar la oclusión del escape de aire del pulmón mediante el hidrogel del péptido de autoensamblaje durante la cirugía. En los otros tres animales, se suturó el tórax y se dejó temporalmente un tubo torácico en el lugar hasta que el aire extrapleurales se evacuara completamente.

- 35 Se insertó un catéter (cánula 12G, LCV-UK estuche, Nippon Sherwood Ltd) en el seno craneal de la vena cava para el monitoreo postoperatorio. Los animales se recuperaron de la anestesia después que se instaló la cánula.

Examen histopatológico

- 40 La muestra de pulmón del animal al que se le realizó la necropsia en la cirugía y que se fijó en formalina, se cortó y se tiñó con hematoxilina y eosina, y se examinó por microscopía óptica para evaluar el sitio que se pinchó y el sellado con el péptido.

Cuidado postoperatorio

- 45 Se administraron 500 mL de Viccillin+LactecD dos veces al día (mañana y tarde) durante 3 días a partir del día 1 después de la operación. Se administró Ampicilina por inyección intramuscular en la cervical posterior el día 4 después de la operación. Como analgésico se administró Buprenorfina (0.01 mg/kg) por inyección intramuscular en la cervical posterior durante los 4 días siguientes a la operación.

Evaluación

- 50 Se hicieron exámenes de Rayos X antes de la operación, después de la operación y antes de la necropsia, mediante el uso del equipo de TV de Rayos X quirúrgico (DHF-105CX-PC, Hitachi Medico Ltd.).

- 55 Desde el día del experimento hasta el día de la necropsia, se observó la apariencia general y la muerte de todos los animales una vez al día.

Todos los animales se pesaron con una balanza de plataforma digital (DUE600ST/ID3s-A, Mettler Toledo Ltd.) el día de la operación, 5 días después de la operación y el día de la autopsia.

- 60 La ingestión de alimentos se revisó todos los días. Cuando había cualquier remanente de alimento, éste se pesó mediante el uso de una balanza de plataforma digital (DUE600ST/ID3s-A, Mettler Toledo Ltd.). Si no quedaban remanentes de la dieta sin comer, el consumo de alimentos se registró como 500 g.

- 65 Para los exámenes hematológicos se colectó la sangre mediante un catéter el día de la operación, 3 días después de la operación, y 7 días después de la operación, y el día de la necropsia. La sangre se depositó en tubos de colección revestidos de EDTA-2K (VP-DK052K05, TERUMO Ltd.). Los conteos de eritrocitos (RBC), conteos de leucocitos (WBC),

concentración de hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), y conteo de plaquetas (PLT) se realizaron mediante el uso de un contador multicanal de células sanguíneas (Sysmex K-4500, Sysmex Ltd.).

La sangre para los exámenes bioquímicos se centrifugó a 3,000 rpm a 4 °C durante 15 min para obtener las muestras de suero que se usaron para medir AST, ALT, ALP, proteínas totales (TP), albúmina (Alb), fracción proteica (alb), globulina alfa 1 (α_1 -glb), globulina alfa 2 (α_2 -glb), beta globulina (β -glb), gamma globulina (γ -glb), relación albúmina/globulina (A/G), bilirrubina total (T-Bil), nitrógeno urea (UN), creatinina (CRE), glucosa (Glu), colesterol total (T-Cho), triglicéridos (TG), sodio, potasio, cloruro, calcio, fosfato inorgánico (IP), y proteína C-reactiva (CRP).

10 Necropsia

Los animales se anestesiaron mediante inyección de pentobarbital sódico 6.4 % en las venas auriculares. Entonces, a los animales se les hizo eutanasia mediante exanguinación al cortar la arteria carótida.

15 Resultados

No se encontró escape de aire del pulmón en ninguno de los animales durante ni después del tratamiento con el péptido. En la Fig. 1 se muestran resultados representativos de los Rayos X. Como se muestra en la Fig. 1, no se encontraron anomalías en el pulmón a partir del día de la operación hasta el día de la necropsia. En la Fig. 2 se muestran resultados representativos de los exámenes histopatológicos. Como se muestra en la Fig. 2, en el examen histopatológico se identificó la oclusión del escape de aire del pulmón mediante uso del hidrogel del péptido de autoensamblaje.

Todos los animales permanecieron en buenas condiciones de estado general durante el experimento. Los animales generalmente mantuvieron el peso corporal y la ingestión de alimentos.

Los resultados de los exámenes hematológicos se muestran en la Tabla 1. Todos los animales mostraron niveles elevados de WBC el día 3 después de la operación, y M0001 mostró un alto WBC el día de la necropsia. Sin embargo, se consideró que estos cambios se debieron a la cirugía abierta, no al hidrogel del péptido de autoensamblaje.

Los resultados de los exámenes bioquímicos se muestran en la Tabla 2. El día 3 después de la operación fue evidente un nivel elevado de CRP. Se consideró que los cambios en la CRP y en otros parámetros se debieron a la cirugía abierta, no al hidrogel de péptido de autoensamblaje.

Tabla 1. Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	RBC				HGB				HCT				PLT				WBC			
	$10^3/\mu\text{L}$				g/dL				%				$10^3/\mu\text{L}$				$10^3/\mu\text{L}$			
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	738	804	661	620	11.9	13.1	10.7	10.1	39.2	45.4	33.6	31.4	47.0	50.8	79.5	103.1	106	113	118	161
M00002	773	712	655	642	13.2	11.9	11.0	10.7	40.4	36.8	35.9	33.1	39.2	45.8	69.5	82.7	90	135	82	91
M00003	705	649	611	638	12.4	11.5	10.7	11.2	38.0	34.7	32.7	34.0	55.4	51.8	89.6	96.0	89	176	99	83
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	739	723	643	633	12.0	12.2	10.6	10.7	39.2	38.3	33.4	32.8	47.2	49.5	77.5	90.6	93	125	100	112

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento).

Tabla 2. Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	AST				ALT				ALP				TP			
	IU/L				IU/L				IU/L				g/dL			
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	20.1	69.5	23.1	19.7	30.3	85.2	49.8	37.2	318.3	279.0	215.0	216.5	7.24	7.97	6.76	6.99
M00002	16.8	26.1	9.3	15.3	23.0	58.7	37.8	29.6	322.7	416.2	235.8	221.5	6.06	6.57	5.95	6.30
M00003	19.6	26.4	17.5	15.8	26.2	47.7	36.1	31.6	357.9	330.7	248.4	241.3	6.24	6.81	6.39	6.44
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	18.8	40.7	16.6	16.9	27.0	63.9	41.2	32.8	333.0	342.0	233.1	226.4	6.51	7.12	6.37	6.58

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento). (Continúa)

Tabla 2. (cont.) Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	Hb g/dL				Hb %				Hb %				Hb %			
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	4.24	3.80	3.78	3.59	60.0	47.7	55.9	51.3	0.9	0.7	0.9	0.8	17.7	19.5	21.5	19.8
M00002	3.90	3.21	3.17	3.18	64.4	48.9	53.3	50.5	0.8	0.7	0.9	0.7	15.7	19.6	22.9	20.7
M00003	3.80	3.31	3.52	3.62	60.9	48.6	55.1	56.2	0.8	0.7	0.9	0.8	15.8	19.7	20.5	19.9
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	4.01	3.44	3.49	3.46	61.8	48.4	54.8	52.7	0.8	0.7	0.9	0.8	16.4	19.6	21.6	20.1

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento). (Continúa)

Tabla 2. (continuación) Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	β-glob				γ-glob				A/G				T-BI			
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	15.0	28.3	16.7	24.5	6.4	3.8	5.0	3.6	1.50	0.91	1.27	1.06	0.09	0.09	0.10	0.08
M00002	12.9	27.1	17.3	24.0	6.2	3.7	5.6	4.1	1.81	0.96	1.14	1.02	0.09	0.09	0.09	0.08
M00003	14.1	26.2	16.4	16.4	8.4	4.8	7.1	6.7	1.55	0.95	1.23	1.28	0.14	0.08	0.09	0.08
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	14.0	27.2	16.8	21.6	7.0	4.1	5.9	4.8	1.62	0.94	1.21	1.12	0.11	0.09	0.09	0.08

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento). (Continúa)

Tabla 2. (continuación) Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	UN mg/dL			CRE mg/dL			Glu mg/dL			T-Chol mg/dL						
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE				
M00001	15.5	9.9	10.1	7.6	1.35	1.40	1.03	0.99	87.9	97.9	74.9	73.6	85.2	96.8	67.2	59.8
M00002	4.6	5.9	7.4	7.0	1.21	0.96	0.94	0.89	86.4	93.6	79.3	68.6	45.4	53.2	47.9	41.2
M00003	4.5	6.0	5.8	8.1	1.44	0.99	1.03	1.04	69.1	82.0	67.7	64.7	39.2	48.3	51.5	36.4
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	8.2	7.3	7.8	7.6	1.33	1.12	1.00	0.97	81.1	91.2	74.0	69.0	56.6	66.1	55.5	45.8

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento). (Continúa)

Tabla 2. (continuación) Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	TG				Na				K				Cl			
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	43.8	40.6	9.4	23.7	157.9 a)	168.7 a)	144.6	141.9	3.66	4.17	3.84	4.13	107.9	123.0	100.4	98.8
M00002	18.5	23.9	13.2	27.5	142.2	143.5	140.7	140.7	3.67	4.15	4.20	4.05	103.0	102.5	99.0	99.0
M00003	17.8	23.6	13.0	27.1	142.3	145.2	142.4	141.2	3.66	4.33	4.07	4.06	101.1	105.2	101.2	98.6
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	26.7	29.4	11.9	26.1	147.5	152.5	142.6	141.3	3.66	4.22	4.04	4.08	104.0	110.2	100.2	98.8

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento).

a): Obtenido en la medición programada (1ra medición) ; el valor que fuera marcadamente mayor que en otros animales se confirmó como correcto en una segunda medición.

(Continúa)

Tabla 2. (continuación) Hallazgos hematológicos en cerdos miniatura

Animal No.	Ca mg/dL			IP mg/dL			CRP µg/mL					
	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE	Pre	AD3	AD7	NE
M00001	11.5	11.4	11.0	11.2	6.7	5.8	6.0	6.0	30.1	88.3	33.7	16.0
M00002	10.3	10.8	10.4	10.6	5.4	5.4	6.1	6.0	20.8	67.9	36.2	37.5
M00003	10.2	10.9	10.7	10.6	6.0	5.2	6.0	6.2	14.4	63.3	26.0	19.4
Número de animales	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Media	10.7	11.0	10.7	10.8	6.0	5.5	6.0	6.1	21.8	73.2	32.0	24.3

Pre: Antes del tratamiento, AD3: 3 días después del tratamiento, AD7: 7 días después del tratamiento, NE: Día de la Necropsia (10 días después del tratamiento).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> 3-D Matrix Ltd.
 <120> PÉPTIDOS ANFIFÍLICOS PARA LA OCLUSIÓN DEL ESCAPE DE AIRE TORÁCICO
 <130> TDX-003.25

10 <150> US 61/530,695
 <151> 2011-09-02
 <160> 9

15 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (16)..(16)
 <223> AMIDACIÓN

35 <400> 1
 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

40 <210> 2
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 45 <223> Péptido sintético
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 50 <223> ACETILACIÓN
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (13)..(13)
 55 <223> AMIDACIÓN
 <400> 2
 Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile
 1 5 10

60 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Péptido sintético

5 <220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
<223> ACETILACIÓN

10 <220>
<221> MOD_RES
<222> (12)..(12)
<223> AMIDACIÓN

15 <400> 3

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
1 5 10

20 <210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 4

Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg
1 5 10 15

30 <210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 5

40 Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala
1 5 10 15

45 <210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

50 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 6

Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp Arg Ala Asp
1 5 10 15

55 <210> 7
<211> 200
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

60 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN
 5
 <220>
 <221> CARACT-MISC
 <222> (5)..(196)
 <223> Una o más repeticiones de RADA pueden estar ausentes
 10
 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (200)..(200)
 <223> AMIDACIÓN
 15
 <400> 7

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 1 5 10 15

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 20 25 30

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 35 40 45

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 50 55 60

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 65 70 75 80

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 85 90 95

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 100 105 110

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 115 120 125

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 130 135 140

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 145 150 155 160

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 165 170 175

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 180 185 190

 Arg Ala Asp Ala Arg Ala Asp Ala
 195 200
 20
 <210> 8
 <211> 200
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETILACIÓN

10

<220>

<221> CARACT-MISC

<222> (5)..(196)

<223> Una o más repeticiones de IEIK pueden estar ausentes

15

<220>

<221> MOD_RES

<222> (200)..(200)

<223> AMIDACIÓN

20

<400> 8

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

1 5 10 15

25

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

20 25 30

30

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

35 40 45

35

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

50 55 60

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

65 70 75 80

40

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

85 90 95

45

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

100 105 110

50

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

115 120 125

50

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

130 135 140

55

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

145 150 155 160

60

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

165 170 175

60

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

180 185 190

65

Ile Glu Ile Lys Ile Glu Ile Lys

195 200

<210> 9
 <211> 200
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> ACETILACIÓN

15 <220>
 <221> CARACT-MISC
 <222> (5)..(196)
 <223> Una o más repeticiones de KLDL pueden estar ausentes.

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (200)..(200)
 <223> AMIDACIÓN

25 <400> 9

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu

30 1 5 10 15

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 20 25 30

35 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 35 40 45

40 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 50 55 60

45 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 65 70 75 80

50 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 85 90 95

Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 100 105 110

55 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 115 120 125

60 Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu Lys Leu Asp Leu
 130 135 140

65

ES 2 653 667 T3

5	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	145	150	155	160
10	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	165	170	175	
15	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu	180	185	190	
20	Lys	Leu	Asp	Leu	Lys	Leu	Asp	Leu									195	200		
25																				
30																				
35																				
40																				
45																				
50																				
55																				
60																				
65																				

Reivindicaciones

- 5 1. Un péptido para usar en la oclusión de escapes de aire del pulmón, caracterizado porque el péptido es un péptido anfifílico con una secuencia de aminoácidos Ac-(RADA)₄-CONH₂ (SEQ ID NO:1), que comprende residuos de aminoácidos con los aminoácidos hidrófilos y los aminoácidos hidrófobos unidos alternativamente, en donde el péptido es un péptido de autoensamblaje que muestra una estructura en lámina beta en solución acuosa en presencia de pH fisiológico y/o en presencia de un catión, y en donde el péptido se proporciona en una solución acuosa al 2.5 % (peso del péptido a volumen).
- 10 2. El péptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido se aplica a los pulmones.
3. El péptido para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el péptido es para aplicación a un bronquio.
- 15 4. El péptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el péptido es para aplicar toracoscópicamente.
5. El péptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde el péptido es para aplicar broncoscópicamente.
- 20 6. El péptido para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el péptido es para administrar en un agente, en donde el agente también incluye al menos una molécula pequeña de un fármaco útil para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, inflamación e infección, en donde la molécula pequeña de fármaco se selecciona de un grupo que consiste en agentes anticáncer, corticoesteroides, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos antibacterianos, antivirales, antifúngicos y parasitocidas.
- 25

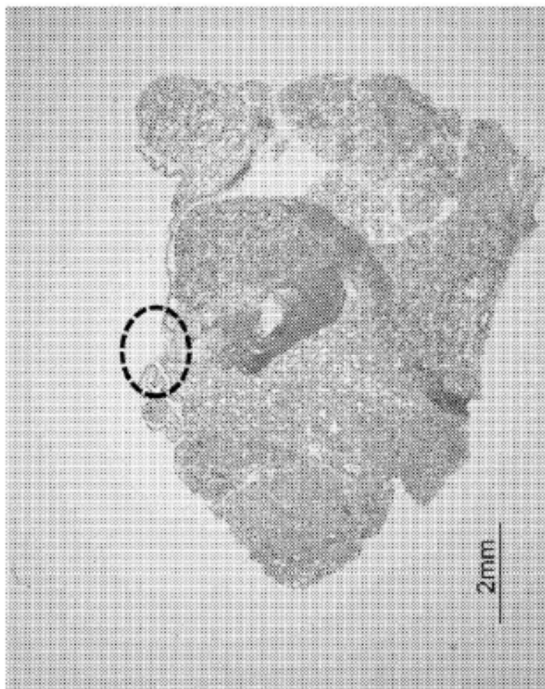
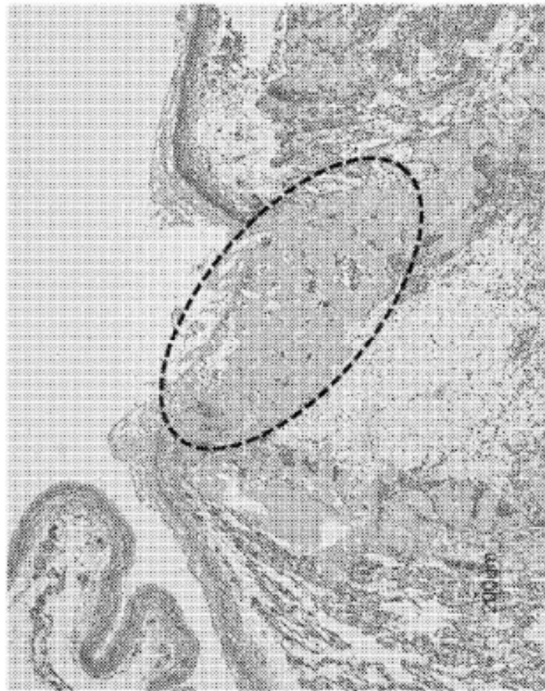


Figura 1

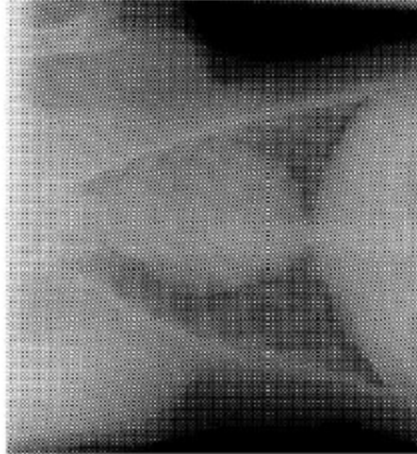


Figura 2