

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 445**

51 Int. Cl.:

C07K 7/64 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 38/19 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2010 PCT/AT2010/000056**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.09.2010 WO10099556**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2010 E 10709949 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2403519**

54 Título: **Procedimiento para la prevención y para el tratamiento de una hiperpermeabilidad**

30 Prioridad:

05.03.2009 AT 3592009

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

05.03.2018

73 Titular/es:

**APEPTICO FORSCHUNG UND ENTWICKLUNG
GMBH (100.0%)
Mariahilferstraße 136, Top 1.15
1150 Wien , AT**

72 Inventor/es:

**FISCHER, BERNHARD y
LUCAS, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 657 445 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

Procedimiento para la prevención y para el tratamiento de una hiperpermeabilidad

La presente invención se refiere a un procedimiento para la prevención y para el tratamiento de una hiperpermeabilidad en células endoteliales y células epiteliales.

- 5 Las células endoteliales y células epiteliales asumen funciones decisivas en todos los tejidos y órganos del cuerpo humano y animal.

10 El endotelio se compone de una capa delgada de células endoteliales. La capa de células endoteliales forma, entre otras, la superficie interior de los vasos sanguíneos, tales como venas y capilares, y la barrera entre la sangre y la pared exterior de los vasos sanguíneos. Las células endoteliales recubren todo el sistema sanguíneo, desde los vasos sanguíneos grandes hasta los capilares más pequeños. Las células epiteliales forman capas celulares simples o multicapa, las cuales cubren todas las superficies corporales interiores y exteriores de los órganos humanos y animales. Las células epiteliales están en una proximidad cercana entre sí, y son ricas en contactos celulares. Para las células epiteliales, puede hacerse una distinción en un lado exterior, apical, que está orientado hacia el exterior o la luz, y un lado basal. Además, las células epiteliales tienen un complejo de adhesión (complejo de unión), que se compone de una zónula ocluyente (unión estrecha), zónula adherente (unión adherente) y desmosoma (mácula adherente), que, por un lado, representa una barrera fisicoquímica y por otro lado, interconecta las células epiteliales adyacentes.

20 Es extremadamente importante para la función fisiológica de los órganos y orgánulos animales y humanos, la integridad, en particular de las células y las capas celulares delimitantes. Si, por ejemplo, se produce una lesión de las células endoteliales o una lesión del endotelio de los vasos sanguíneos, el líquido puede escapar de los vasos sanguíneos y llevar a trastornos masivos en la vitalidad del organismo global.

Si, por ejemplo, se produce una lesión de las células epiteliales o una lesión del epitelio de los órganos, el líquido tanto puede escapar de los órganos o el líquido puede penetrar, y de esta manera, dañar gravemente la funcionalidad de los órganos.

- 25 Mediante una lesión del endotelio y del epitelio puede producirse una denominada hiperpermeabilidad, es decir, un paso descontrolado del líquido desde los vasos sanguíneos y hasta los órganos y tejidos vitales.

30 Además de las causas mecánicas, una infección o el impacto de toxinas, puede llevar a una hiperpermeabilidad. Las toxinas microbianas son moléculas formadoras de poros que se unen al colesterol, que se liberan por bacterias Gram positivas. Debido al efecto de las toxinas, se generan en primer lugar poros en las membranas celulares y luego macroporos. De esta manera, las capas celulares llegan a ser permeables para el líquido y las sustancias contenidas en el mismo.

35 Toxinas conocidas son, entre otras, listeriolisina de *Listeria monocytogenes* o también de neumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Estas toxinas pueden llevar a la formación de moléculas de oxígeno reactivas en las células. Las moléculas de oxígeno reactivas causadas por las toxinas llevan después a un daño del endotelio y del epitelio entre otras cosas, debido a que se daña la función de barrera de las células.

40 Para la conservación de la función de barrera de las capas de células endoteliales y capas de células epiteliales, las células se interconectan por medio de fibras de proteína. Los constituyentes de tales fibras de proteína son, por ejemplo, la cadena ligera de miosina. Sin embargo, debido a una fosforilación de la cadena ligera de miosina, se producen tensiones en las células y las conexiones célula-célula, así como la formación de espacios intercelulares, mediante lo cual el líquido puede penetrar y también derramarse de manera descontrolada.

45 Un componente adicional en la regulación de la función de barrera de las células epiteliales y las células endoteliales es la proteína quinasa C. Para las proteínas quinasa C, se conocen varias isoenzimas, por ejemplo, la proteína quinasa alfa y zeta. Estas isoenzimas de la proteína quinasa C se activan por las moléculas de oxígeno reactivas, peróxido de hidrógeno, toxinas microbianas, tales como neumolisina y listeriolisina y las proteínas de coronavirus hidrófilas. Además, la proteína quinasa C activada lleva a una reducción de la expresión del canal de sodio epitelial (ENaC), que es responsable del transporte de sodio y líquido en las células epiteliales, y de esta manera, la proteína quinasa C activada contribuye esencialmente al desarrollo de una hiperpermeabilidad.

50 Otras causas para el desarrollo de una hiperpermeabilidad en los pulmones son, por ejemplo, virus, tales como los virus influenza, coronavirus asociados con el síndrome respiratorio agudo grave (SRAG-CoV) ("Severe Acute Respiratory Syndrome-associated Coronavirus" o el virus sincitial respiratorio "Respiratory Syncytial Virus", que pueden llevar a una hiperpermeabilidad del endotelio y epitelio, así como a una neumonía atípica. Es sabido que las proteínas de SRAG-CoV, debido a la activación de la isoforma de la proteína quinasa C, llevan a una reducción del nivel y la actividad del canal de sodio epitelial, lo que favorece el desarrollo de una hiperpermeabilidad. También es sabido que para estas enfermedades víricas de los pulmones, no muestran efecto alguno los agonistas beta-2-adrenérgicos usados frecuentemente.

55

De esta manera, en total, es sabido que las toxinas microbianas llevan a un nivel elevado de moléculas de oxígeno reactivas en las células endoteliales y epiteliales. De esta manera se produce la fosforilación de la cadena ligera de miosina, lo que, a su vez, lleva a un trastorno de la interacción célula-célula y al desarrollo de una hiperpermeabilidad.

- 5 Las toxinas microbianas, las moléculas de oxígeno reactivas, así como las proteínas víricas, llevan a una activación de las isoenzimas de la proteína quinasa C. La activación de la proteína quinasa C lleva después a una disminución de la expresión del canal de sodio epitelial (ENaC) y la inhibición de su actividad. También, estos mecanismos llevan al desarrollo de una hiperpermeabilidad en el endotelio y el epitelio.

- 10 Una hiperpermeabilidad de los tejidos de los pulmones es un constituyente esencial de diferentes enfermedades de los pulmones, por ejemplo, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), inflamación pulmonar (neumonía). En la actualidad, no hay una terapia estándar para el tratamiento de una hiperpermeabilidad del endotelio y del epitelio.

El documento DE 600 04 340 T2 describe determinados inhibidores de tirosina quinasa (1,4-dihidroindeno[1,2-C]pirazoles sustituidos) para la prevención de la hiperpermeabilidad vascular y de los edemas asociados con esta.

- 15 El documento US 2003/0185791 A1, el documento EP 2 009 023 A1, el documento WO 2006/013183 A1, el documento EP 1 264 559 A1 y Marquardt et al. (J. Pept. Sci. 13 (2007): 803-810) divulgan péptidos derivados de TNF para el tratamiento de edemas.

- 20 Por lo tanto, es objetivo de la presente invención proporcionar medios y procedimientos con los que pueden prevenirse o tratarse enfermedades en las que la prevención de una hiperpermeabilidad de células epiteliales y células endoteliales desempeña un papel esencial en el tratamiento, en particular enfermedades pulmonares, tales como lesiones pulmonares agudas, SDRA o enfermedades pulmonares víricas.

En particular, con la invención se proporcionará una molécula biológicamente efectiva para la prevención y el tratamiento de la hiperpermeabilidad del endotelio y epitelio y para la prevención y el tratamiento del daño pulmonar agudo y las consecuencias de la neumonía.

- 25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un péptido que se compone de 7-17 aminoácidos adyacentes y que comprende el hexámero TX₁EX₂X₃E, en el que X₁, X₂ y X₃ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, en el que el péptido no presenta actividad de unión de receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.

- 30 Preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido que se compone de 7-17 aminoácidos adyacentes y que comprende el hexámero TPEGAE (SEQ ID No. 4), en el que el péptido no presenta actividad de unión de receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.

- 35 Una forma de realización especialmente preferida de la presente invención se refiere a un péptido ciclado que se compone de una secuencia de aminoácidos sucesivos, seleccionada del grupo que consiste en

- QRETPEGAEAKPWY (SEQ ID No. 5)
- PKDTPEGAEALKPWY (SEQ ID No. 6)
- CGQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID No. 1) y
- CGPKDTPEGAEALKPWYC (SEQ ID No. 7)

- 40 y fragmentos de al menos 7 aminoácidos de las mismas que presentan fragmentos del hexámero TPEGAE, para la producción de un medicamento para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.

- 45 Los péptidos de acuerdo con la invención se usan preferentemente para la aplicación para la prevención de edemas en el caso de neumonía, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o enfermedades pulmonares bacterianas o víricas, en particular infecciones con *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, virus influenza, SRAG o VRS. La causa de la inflamación pulmonar (neumonía), que puede tratarse o prevenirse de acuerdo con la invención, es independiente de la causa de la inflamación pulmonar e independiente de si es una inflamación aguda o crónica. Por consiguiente, de acuerdo con la invención, pueden tratarse, preferentemente, las neumonías, que son provocadas por una infección con bacterias, virus, micoplasmas, protozoarios, gusanos u hongos, pero también las inflamaciones pulmonares provocadas de manera tóxica (por ejemplo, por inhalación de sustancias venenosas) o de manera inmunológica o por radiación (por ejemplo, rayos X, terapia de radiación en pacientes con cáncer). Especialmente en el caso de las inflamaciones pulmonares provocadas por inhalación de sustancias venenosas o irradiación, sin embargo, el aspecto preventivo de la presente invención es particularmente esencial, también en personas postradas en cama, en particular personas mayores, o para personas
- 50 inmunocomprometidas, tales como pacientes con VIH o pacientes de trasplante. En particular, de acuerdo con la invención, la inflamación pulmonar puede combatirse o prevenirse en un momento en el que aún no puede
- 55

apreciarse daño alguno mediante rayos X.

Los patógenos de las neumonías primarias son principalmente neumococos, estafilococos, *Haemophilus influenzae*, micoplasmas, clamidia, legionella (*Legionella pneumophila*) y virus tales como el virus de la gripe, adenovirus y virus de parainfluenza. Para las neumonías secundarias, el espectro de los patógenos se cambia al virus del herpes (CMV, VHS), hongos, *Pneumocystis jirovecii*, protozoarios (toxoplasmosis), así como bacterias anaerobias. En particular, las inflamaciones pulmonares que se provocan por estos patógenos, pueden tratarse, de acuerdo con la invención, de manera especialmente preferida o prevenirse (en particular, en cuanto a las neumonías secundarias).

Los péptidos de acuerdo con la invención son, por ejemplo, conocidos por la patente Europea EP-1 264 599-B1, y se propusieron en el estado de la técnica para el tratamiento de acumulaciones de líquido (edema pulmonar) y, en particular, para la reabsorción de estas acumulaciones de líquido, devolviéndose el líquido de edema desde los alvéolos del tejido pulmonar a los capilares, es decir, bombeándose desde los alvéolos.

De acuerdo con la invención, se ha demostrado de manera totalmente sorprendente, que estos péptidos también influyen en el flujo de líquido opuesto a través del endotelio de los capilares hacia el epitelio del pulmón, sin embargo, de una manera contraria: mientras que en el tratamiento de edemas, el transporte fuera del líquido requiere mecanismos de bombeo abiertos y completamente activos, de acuerdo con la invención, se detiene el pasaje del líquido a los alvéolos; de esta manera, se evita la entrada desde el principio. La activación de la reabsorción del edema de acuerdo con el documento EP 1 264 599 B1, mediante los péptidos de acuerdo con la invención, por lo tanto, parece que se basa en un mecanismo completamente diferente - que discurre en la dirección opuesta y regulador - que la reducción de la hiperpermeabilidad de acuerdo con la invención, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial, mediante lo cual los edemas se previenen incluso evitando la transferencia de líquido a los alvéolos. Por consiguiente, con la presente invención - además del tratamiento de edema del documento EP 1 264 599 B1 (que se muestra solo en un estadio tardío de la evolución de la enfermedad) - se abren indicaciones totalmente nuevas y sorprendentes para los péptidos de acuerdo con la invención.

Por consiguiente, la presente invención se basa en la circunstancia de que también se encontró dentro del transcurso de los trabajos para la invención, que los péptidos usados de acuerdo con la invención, tal como se han definido en el documento EP 1 264 599 B1, tienen una influencia sobre los efectos de las toxinas, moléculas de oxígeno reactivas, sobre la activación de la proteína quinasa C, la fosforilación de la cadena ligera de miosina y la expresión del canal de sodio epitelial. Esto no fue esperado con base en el conocimiento existente acerca de estos péptidos.

Un péptido muy especialmente preferido para la aplicación de acuerdo con la presente invención se compone de la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y está ciclado a través de los residuos de C (en posición 1 y 17).

La ciclación de los péptidos de acuerdo con la invención puede conseguirse a través de una ciclación directa a través de un puente disulfuro entre los dos residuos de C en el extremo N y C terminal, o acoplándose el péptido a través de ambas cisteínas a una sustancia de soporte. A este respecto, en los péptidos de acuerdo con la invención, los residuos de cisteína se proporcionan, preferentemente, al comienzo y al final de la molécula. También pueden usarse otros grupos funcionales que consiguen una ciclación del péptido, por ejemplo, llevando un grupo ácido con una amina o un alcohol que lleva a un cierre de anillo de amida o éster (en este caso pueden ciclarse preferentemente intramolecularmente, por ejemplo, los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico con serina, treonina, tirosina, asparagina, glutamina o lisina). Por lo tanto, otros péptidos preferidos de acuerdo con la invención, son, por ejemplo, CGQKETPEGAEAKPWYC (SEQ ID No. 8), CGQRETPEGAEARPWYC (SEQ ID No. 9), CGQRETPEGAEAKPC (SEQ ID No. 10), CQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID No. 11) o CGQRETPEGAEAKFWYC (SEQ ID No. 12).

Como sustancias de soporte se tienen en cuenta todas las sustancias comunes, que pueden usarse farmacéuticamente, que pueden, por ejemplo, formar un enlace covalente con los grupos SH de las cisteínas, siendo especialmente adecuados las proteínas de soporte comunes, tales como hemocianina de lapa californiana (KLH), toxina de tétanos, etc. Los residuos bifuncionales adyacentes también pueden proporcionarse en el soporte (por ejemplo, el grupo ácido junto a grupo amina o alcohol). En este aspecto, es importante que la "ciclación" comprenda el cierre de anillo intramolecular como la integración de un soporte (del que sobresale el péptido enlazado (estando unido al soporte el extremo N y C terminal del péptido)), mostrando el péptido ciclado de tal manera que muestra la estructura espacial cíclica y estando estabilizado de manera correspondiente.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden usarse preferentemente para proteger células epiteliales y células endoteliales frente a hiperpermeabilidad, desencadenada por moléculas de oxígeno reactivas o por toxinas bacterianas.

Los péptidos de acuerdo con la invención pueden usarse también para inhibir la fosforilación de la cadena ligera de miosina, para inhibir la activación de la proteína quinasa C o para aumentar la expresión del canal de sodio epitelial.

A este respecto, los péptidos de acuerdo con la invención pueden usarse para la prevención de edemas mediante disminución de una hiperpermeabilidad, desencadenada por moléculas de oxígeno reactivas, toxinas microbianas,

microorganismos Gram positivos o mediante ataque de virus pulmonar.

De acuerdo con otro aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene un péptido de acuerdo con la invención (o una mezcla de distintos péptidos de acuerdo con la invención) y un vehículo farmacéutico. Esta composición farmacéutica se emplea de acuerdo con la invención para la prevención y el tratamiento de hiperpermeabilidad, tal como se describió anteriormente, en particular para la prevención y el tratamiento de neumonía, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o enfermedades pulmonares víricas, en particular infecciones con *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, SRAG, VRS, o virus influenza, en particular virus influenza A. La expresión "una composición farmacéutica" se refiere a cualquier composición que comprende un péptido, tal como se define anteriormente, que previene, mejora o cura los estados que se describen en el presente documento. En particular, la expresión "una composición farmacéutica" se refiere a una composición que presenta un péptido, tal como se describe anteriormente, y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambas expresiones pueden usarse de manera intercambiable). Vehículos o excipientes adecuados, que son conocidos por el experto, son solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa al 5% en solución salina, sustancias que mejoran la isotonía y la estabilidad química, tampones y agentes conservantes. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que no induce en sí la producción de anticuerpos que son dañinos para el individuo que recibe la composición, tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. A este respecto, el péptido de acuerdo con la invención también puede ciclarse a estos vehículos por medio de un enlace covalente directo. Esta composición farmacéutica puede administrarse (como medicamento) con cualquier procedimiento adecuado conocido por el experto. La ruta de administración preferida es la administración parenteral, en particular, por inhalación (con aerosoles) o administración intravenosa. En el caso de la administración parenteral, el medicamento de esta invención se formula en una forma de dosis unitaria, inyectable, tal como solución, suspensión o emulsión, en conjunto con el excipiente farmacéuticamente aceptable definido anteriormente. Sin embargo, la dosificación y el tipo de administración, dependen del individuo. En general, el medicamento se administra de modo que el péptido de la presente invención se administre a una dosis entre 1 µg/kg y 10 mg/kg, más preferentemente entre 10 µg/kg y 5 mg/kg, de manera sumamente preferente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferentemente se administra como dosis en bolo. Puede usarse también una infusión continua. En este caso, el medicamento puede infundirse en una dosis de entre 5 y 20 µg/kg/minuto, más preferentemente entre 7 y 15 µg/kg/minuto.

De acuerdo con la presente, un péptido de acuerdo con la invención especialmente preferido tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: SEQ ID:NO:1 (NH₂)Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys(COOH).

La determinación de la concentración de las moléculas de oxígeno reactivas en las células endoteliales cultivadas de los pulmones dio como resultado que con el cultivo de las células endoteliales con un contenido normal de oxígeno del 21% (mezcla de gas normóxica), se produce solamente una baja formación de moléculas de oxígeno reactivas. Con la deficiencia de oxígeno (0,1% de oxígeno, mezcla de gas hipóxica), sin embargo, se produce una formación 3 veces mayor de moléculas de oxígeno reactivas. Si, sin embargo, un péptido de acuerdo con la invención, en particular, el péptido SEQ ID No. 1, se agrega a células endoteliales que se cultivan bajo la carencia de oxígeno (contenido en oxígeno del 0,1%, mezcla de gas hipóxica), no se forman sorprendentemente moléculas de oxígeno reactivas mediante las células endoteliales.

Otros exámenes determinaron la resistencia eléctrica de las capas celulares de las células endoteliales y epiteliales humanas, por medio del análisis de impedancia de sustrato celular eléctrico antes, durante y después de la adición las toxinas microbianas neumolisina y listeriolisina. Los exámenes mostraron que con una adición de 125 ng/ml y 250 ng/ml de listeriolisina a las células endoteliales humanas cultivadas, se inicia el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Este proceso se mejoró aún por una concentración de toxina de 250 ng/ml de listeriolisina. La adición de 62.5 ng/ml de neumolisina a las células endoteliales humanas cultivadas también llevó al desarrollo de una hiperpermeabilidad. Este proceso se mejoró aún por una concentración de toxina de 125 ng/ml de neumolisina. Sin embargo, sorprendentemente, se encontró que la adición de un péptido de acuerdo con la invención, en particular 50 µg/ml del péptido SEQ ID No. 1, se inhibe la hiperpermeabilidad tanto inducida por neumolisina como inducida por listeriolisina.

Otros exámenes mostraron que también en las células endoteliales humanas puede inducirse por las toxinas microbianas una hiperpermeabilidad. De esta manera, la incubación de células epiteliales humanas con 1 µg/ml de listeriolisina, lleva a una clara hiperpermeabilidad. De manera sorprendente, sin embargo, se encontró que la hiperpermeabilidad se inhibe mediante la adición de péptido de acuerdo con la invención, en particular 50 µg/ml del péptido SEQ ID No. 1.

Otros exámenes mostraron que una adición de 125 ng/ml de listeriolisina a las células pulmonares endoteliales humanas, lleva a un aumento del contenido de la cadena ligera de miosina fosforilada. Este efecto se refuerza aún por una concentración de toxina de 250 ng/ml de listeriolisina. Una adición de 62,5 ng/ml de la toxina neumolisina a las células pulmonares endoteliales humanas, llevó a un aumento del contenido relativo en la cadena ligera de miosina fosforilada. Este efecto se mejoró aún por una concentración de toxina de .125 ng/ml de neumolisina. Sin embargo, de manera sorprendente, se encontró que una adición de péptido de acuerdo con la invención, en

particular 50 µg/ml del péptido SEQ ID No. 1, inhibe la fosforilación de la cadena ligera de miosina provocada por las toxinas listeriolisina y neumolisina.

5 Otros exámenes dieron como resultado que con la aplicación intratraqueal de toxinas en ratones, se estimula una hiperpermeabilidad de los pulmones de los ratones, lo que se detectó por que el colorante azul de Evans pasa desde los vasos sanguíneos al tejido pulmonar. Sin embargo, sorprendentemente, se encontró que con la aplicación intratraqueal de un péptido de acuerdo con la invención, en particular de 50 µg de péptido SEQ ID No. 1, se produce una inhibición de la hiperpermeabilidad provocada por toxinas.

10 Otros exámenes mostraron que estimulando la hiperpermeabilidad en los pulmones de ratones, estimulados por la aplicación intratraqueal de toxina, por ejemplo, 250 ng de neumolisina, se produce un número elevado de leucocitos en el líquido broncoalveolar. Sin embargo, sorprendentemente, se encontró que con la aplicación intratraqueal de péptido de acuerdo con la invención, en particular, 50 µg de péptido SEQ ID No. 1, se inhibe el desarrollo de la hiperpermeabilidad debido a toxinas, y claramente están presentes menos leucocitos en el líquido broncoalveolar de los pulmones de los ratones.

15 Otros exámenes dieron como resultado que la toxina bacteriana lleva a un aumento sustancial del contenido en proteína quinasa C alfa activada en las células endoteliales humanas de los pulmones. Sin embargo, sorprendentemente, se encontró que una adición de péptido de acuerdo con la invención, en particular de péptido SEQ ID No. 1, inhibe este efecto mediado por toxina, y de esta manera, lleva a un aumento en la expresión del canal de sodio epitelial. Sorprendentemente, también se encontró que una adición del péptido de acuerdo con la invención, en particular del péptido SEQ ID No. 1, a células epiteliales humanas, lleva a un aumento sustancial de la expresión del canal de sodio epitelial (ENaC). La invención se explica ahora con más detalle por medio de los siguientes ejemplos y figuras, a los que, naturalmente, no está limitada.

20

La Figura 1A muestra el cromatograma de HPLC de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 1. Unidades: eje y "absorción en mAU"; eje x "tiempo en minutos".

25 La Figura 1B muestra el cromatograma de HPLC de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2. unidades: eje y "absorción en mAU"; eje x "tiempo en minutos".

La Figura 1C muestra el cromatograma de HPLC de la proteína con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3. unidades: eje y "absorción en mAU"; eje x "tiempo en minutos".

30 la Figura 2A muestra los espectros de resonancia electrónica paramagnética (EPR) de células endoteliales que se cultivaron con 21% de oxígeno (mezcla de gas normóxica) o con 0,1% de oxígeno (mezcla de gas hipóxica) con y sin adición del péptido SEQ ID No. 1 o péptido SEQ ID No. 3.

35 La Figura 2B muestra el contenido relativo en moléculas de oxígeno reactivas (superóxido) en células endoteliales que se cultivaron o bien con 21% de oxígeno (mezcla de gas normóxica) o con 0,1% de oxígeno (mezcla de gas hipóxica) con y sin adición del péptido SEQ ID No. 1, o con 0,1% de oxígeno (mezcla de gas hipóxica) con y sin adición del péptido SEQ ID No. 3.

La Figura 3A muestra la evolución de la resistencia eléctrica de células epiteliales humanas del pulmón sin adición de toxina listeriolisina, así como después de la adición de 125 ng/ml de listeriolisina (125 ng/ml de LLO) y después de la adición de 500 ng/ml de listeriolisina (500 ng/ml de LLO).

40 La Figura 3B muestra la evolución de la resistencia eléctrica de células epiteliales humanas del pulmón sin adición de toxina neumolisina, así como después de la adición de 62,5 ng/ml de neumolisina (62,5 ng/ml de PLY) y después de la adición de 250 ng/ml de neumolisina (250 ng/ml de PLY).

45 La Figura 3C muestra la evolución de la resistencia eléctrica de células epiteliales humanas del pulmón sin adición de toxina neumolisina / péptido SEQ ID No. 1 (control), así como después de la adición de 125 ng/ml de neumolisina (125 ng/ml de PLY) y después de la adición de 125 ng/ml de neumolisina / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 (125 ng/ml de PLY / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1).

La Figura 3D muestra la evolución de la resistencia eléctrica de células epiteliales humanas del pulmón sin adición de toxina listeriolisina / péptido SEQ ID No. 1 (control), así como después de la adición de 500 ng/ml de listeriolisina (500 ng/ml de LLO) y después de la adición de 500 ng/ml de listeriolisina / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 (500 ng/ml de LLO / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1).

50 La Figura 3E muestra la evolución de la resistencia eléctrica de células endoteliales humanas del pulmón sin adición de toxina listeriolisina / péptido SEQ ID No. 1 (control), así como después de la adición de 1 µg/ml de listeriolisina (1 µg/ml de LLO) y después de la adición de 1 µg/ml de listeriolisina / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 (1 µg/ml de LLO / 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1).

55 La Figura 4A muestra el contenido relativo de cadena ligera de miosina fosforilada en células endoteliales humanas del pulmón en función de la concentración de la toxina listeriolisina (125 ng/ml de LLO, 250 ng/ml de LLO, 500 ng/ml de LLO).

La Figura 4B muestra el contenido relativo de cadena ligera de miosina fosforilada en células endoteliales humanas del pulmón en función de la concentración de la toxina neumolisina (62,5 ng/ml de PLY, 125 ng/ml de PLY, 250 ng/ml de PLY).

60 La Figura 4C muestra el contenido relativo de cadena ligera de miosina fosforilada en células endoteliales humanas del pulmón en función de la adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1, 250 ng/ml de toxina listeriolisina (LLO), 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 / 250 ng/ml de toxina listeriolisina (LLO), 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3 / 250 ng/ml de toxina listeriolisina (LLO).

La Figura 4D muestra el contenido relativo de cadena ligera de miosina fosforilada en células endoteliales humanas del pulmón en función de la adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1, 125 ng/ml de toxina neumolisina (PLY), 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 / 125 ng/ml de toxina neumolisina (PLY), 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3 / 125 ng/ml de toxina neumolisina (PLY).

5 La Figura 5A muestra el contenido en colorante azul de Evans en el tejido pulmonar de ratones 5,5 horas después de la administración intratraqueal de la toxina neumolisina con las dosis 250 ng neumolisina por ratón (250 ng PLY) y 500 ng neumolisina por ratón (500 ng PLY).

La Figura 5B muestra el contenido en colorante azul de Evans en el tejido pulmonar de ratones 5,5 horas después de la administración intratraqueal de 250 ng de toxina neumolisina por ratón, así como después de la administración intratraqueal de 250 ng de toxina neumolisina y 50 µg de péptido SEQ ID No. 1 por ratón.

10 La Figura 5C muestra el contenido de leucocitos en el líquido broncoalveolar de los pulmones de ratones 5,5 horas después de la administración intratraqueal de 250 ng de toxina neumolisina por ratón, así como después de la administración intratraqueal de 250 ng de toxina neumolisina y 50 µg de péptido SEQ ID No. 1 por ratón.

15 La Figura 6 indica el contenido en proteína quinasa C alfa activada en relación con el contenido total de proteína quinasa C alfa, en función de la incubación de células pulmonares endoteliales humanas con 250 ng/ml de toxina neumolisina (250 ng/ml de PLY) y la mezcla de 250 ng/ml de toxina neumolisina y 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 (250 ng/ml de PLY/50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1).

La Figura 7 muestra la expresión del canal de sodio epitelial (ENaC) en células pulmonares epiteliales humanas en comparación con condiciones de cultivo celular sin y después de la adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1, así como después de la adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3. El contenido en mRNS para ENaC se determinó por medio de "PCR en tiempo real".

La Figura 8 muestra el cambio del peso corporal de los animales de ensayo con una neumonía vírica (Grupo 1: control negativo (PBS); Grupo 2: control positivo (influenza A por vía nasal); Grupo 3: influenza A por vía nasal + 10 µg de péptido SEQ.ID.NO. 1 por vía intratraqueal);

25 La Figura 9 muestra el cambio de la temperatura corporal de animales de ensayo de estos grupos 1 a 3;

La Figura 10 muestra la tasa de supervivencia de animales de ensayo de estos grupos 1 a 3.

Ejemplos

Ejemplo 1A: Síntesis de un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1

30 Se sintetizó de manera totalmente automática un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 por medio de síntesis en fase sólida de Fmoc en las siguientes etapas:

Etapa	Proceso	Producto
1	Acoplamiento de los aminoácidos	Péptido unido a la fase sólida
2	Escisión de la fase sólida	Péptido en disolución
3	Purificación	Péptido purificado como sal de TFA
4	Purificación / intercambio de sal	Péptido purificado como sal de acetato
5	Examen analítico	Péptido purificado

A continuación se cicló el péptido SEQ ID No. 1 mediante formación oxidativa de un puente disulfuro entre las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína (posición 1) y cisteína (posición 17).

35 A continuación se examinó el péptido por medio de HPLC inversa, obteniéndose el resultado tal como se muestra en la Figura 1A. La pureza del péptido SEQ ID No. 1 era superior al 95%.

Ejemplo 1B: Síntesis de un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2

en la que se forma un enlace amida entre el grupo amino de la cadena lateral de la lisina Lys (I) y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico Glu (19).

40 Se sintetizó de manera totalmente automática un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 2 por medio de síntesis en fase sólida de Fmoc en las siguientes etapas:

Etapa	Proceso	Producto
1	Acoplamiento de los aminoácidos	Péptido unido a la fase sólida
2	Escisión de la fase sólida	Péptido en disolución
3	Purificación	Péptido purificado como sal de TFA
4	Purificación / intercambio de sal / ciclación oxidativa	Péptido purificado como sal de acetato
5	Examen analítico	Péptido purificado

5 La ciclación tuvo lugar mediante la unión del grupo amino épsilon de la lisina (posición 1) con el grupo carboxilo gamma del ácido glutámico (posición 19) con la formación de un enlace amida. Esto tiene lugar por ejemplo porque el grupo carboxilo gamma del grupo glutamina se convierte por medio de dicitohexilcarbodiimida (DHC) en un éster activo que, a continuación, reacciona espontáneamente con el grupo amino épsilon de la lisina con la formación de un cierre de anillo en el péptido.

A continuación se examinó el péptido por medio de HPLC inversa, obteniéndose el resultado tal como se muestra en la Figura 1B. La pureza del péptido SEQ ID No. 2 era superior al 95%.

Ejemplo 1C: Síntesis de un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3

SEQ ID No. 3

(NH₂) Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Ala-Pro-Ala-Gly-Ala-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys (COOH)

10 Se sintetizó de manera totalmente automática un péptido con la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 3 por medio de síntesis en fase sólida de Fmoc en las siguientes etapas:

Etapa	Proceso	Producto
1	Acoplamiento de los aminoácidos	Péptido unido a la fase sólida
2	Escisión de la fase sólida	Péptido en disolución
3	Purificación	Péptido purificado como sal de TFA
4	Purificación / intercambio de sal	Péptido purificado como sal de acetato
5	Examen analítico	Péptido purificado

A continuación se cicló el péptido SEQ ID No. 3 mediante formación oxidativa de un puente disulfuro entre las cadenas laterales de los aminoácidos cisteína (posición 1) y cisteína (posición 17).

15 A continuación se examinó el péptido por medio de HPLC inversa, obteniéndose el resultado que se muestra en la Figura 1C. La pureza del péptido SEQ ID No. 3 era superior al 95%. La diferencia entre péptido SEQ ID No. 3 y el péptido SEQ ID No. 1 consiste en que los aminoácidos Thr(6), Glu(8), Glu(11) del péptido SEQ ID No. 1 se encuentran en Ala(6), Ala(8) y Ala(11) en el péptido SEQ ID No. 3.

Ejemplo 2: Influencia del péptido SEQ ID No. 1 sobre moléculas de oxígeno reactivas

20 Cultivo celular de células endoteliales

El cultivo celular de células endoteliales tuvo lugar con adición y sin adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1 o con adición y sin adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3.

25 Para la generación de las moléculas de oxígeno reactivas, las células endoteliales arteriales se cultivaron en una mezcla de gas deficiente en oxígeno del 0,1% de oxígeno, 5% de monóxido de carbono y 94,9% de nitrógeno (mezcla de gas hipóxica). En los experimentos de control, las concentraciones de gas fueron de 21% de oxígeno, 5% de monóxido de carbono y 74% de nitrógeno (mezcla de gas normóxica).

30 Después de 90 minutos bajo las condiciones deficientes en oxígeno, las células endoteliales se cultivaron durante 30 minutos más con 21% de oxígeno. Después se añadió a las células 20 µl de una solución que se componía de 1-hidroxi-3-metoxicarbonil-2,2,5,5-tetrametilpirrolidina HCl (CHM) 20 µM, DPBS 20 µM, desferrioxamina 25 µM y dietilditiocarbamato 5 µM, así como 2 µl de DMSO.

Tripsinización de las células

Después del cultivo celular se individualizaron las células de manera habitual en el laboratorio mediante la adición de una solución de tripsina. Las células endoteliales se lavaron y se suspendieron en 35 µl de una solución que se componía de DPBS y desferrioxamina 25 µM y dietilditiocarbamato 5 µM.

35 Medición de la Resonancia electrónica paramagnética (EPR)

La determinación de la resonancia electrónica paramagnética (EPR), denominada también resonancia de espín electrónico, sirve para examinar sustancias paramagnéticas, por ejemplo para la detección de electrones no apareados en moléculas de oxígeno reactivas (radicales del oxígeno).

40 Para ello se colocaron las células tratadas previamente en capilares de 50 µl y se examinaron en un ESR MiniScope MS200 de la empresa Magnettech (Berlín, Alemania) a 40 mW de microondas, 3000 mG de amplitud de modulación, 100 kHz de frecuencia de modulación.

5 Tal como muestran las Figuras 2A y 2B, en el caso de una concentración de oxígeno normal de 21% (mezcla de gas normóxico) se produce solamente una pequeña formación de moléculas de oxígeno reactivas. Bajo una deficiencia de oxígeno (0,1% de oxígeno, mezcla de gas hipóxico) se produce una formación 3 veces mayor de moléculas de oxígeno reactivas. Si, sin embargo, el péptido SEQ ID No. 1 ha de añadirse a células endoteliales, que se cultivan bajo deficiencia de oxígeno (contenido en oxígeno 0,1%, mezcla de gas hipóxico), entonces no se forman moléculas de oxígeno reactivas por las células endoteliales.

A diferencia del péptido SEQ ID No. 1, una adición de péptido SEQ ID No. 3 a las células endoteliales, que se cultivan bajo deficiencia de oxígeno (contenido en oxígeno 0,1%, mezcla de gas hipóxico), no lleva a una inhibición de la formación de moléculas de oxígeno reactivas por las células endoteliales.

10 La diferencia entre péptido SEQ ID No. 3 y péptido SEQ ID No. 1 consiste en que los aminoácidos Thr(6), Glu(8), Glu(11) del péptido SEQ ID No. 1 se encuentran en Ala(6), Ala(8) y Ala(11) en el péptido SEQ ID No. 3.

Ejemplo 3: Inhibición de la hiperpermeabilidad en células endoteliales y células epiteliales por el péptido SEQ ID No. 1

Materiales

15 Las células epiteliales humanas del pulmón tipo H441 se adquirieron de la empresa ATTC.

Las células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se adquirieron de la empresa Lonza.

Las toxinas microbianas listeriolisina (LLO) y neumolisina (PLY) se adquirieron de la Universidad de Giessen.

Cultivo celular

20 Las células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se cultivaron de manera habitual en el laboratorio.

Las células epiteliales del pulmón tipo H441 se cultivaron de manera habitual en el laboratorio en un medio RPMI 1640 comercial con los aditivos L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, glucosa 4,5 g/l, tampón HEPES 10 mM pH 7,4, suero bovino al 10%. Los experimentos de ECIS tuvieron lugar en medio libre de suero.

25 Hiperpermeabilidad

Para provocar la hiperpermeabilidad, es decir, lesiones de las células endoteliales y las células epiteliales, las células epiteliales humanas del pulmón, así como las células endoteliales humanas del pulmón, se cultivaron de manera habitual en el laboratorio, hasta la formación de una capa celular continua, y a subsecuentemente, se añadieron las toxinas listeriolisina o neumolisina.

30 Determinación de la resistencia transendotelial

Antes, durante y después de la adición de las toxinas microbianas neumolisina y listeriolisina a células endoteliales humanas, se determinó la resistencia eléctrica de la capa celular (resistencia transendotelial) por medio del análisis de impedancia del sustrato celular eléctrico.

35 Como se muestra en la Figura 3A, la resistencia eléctrica disminuye con una adición de 125 ng/ml de listeriolisina a células endoteliales humanas cultivadas. Se produce el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Este efecto es aún más claro con una mayor cantidad de 500 ng/ml de listeriolisina.

Como se muestra en la Figura 3B, la resistencia eléctrica disminuye con una adición de 62,5 ng/ml de neumolisina a células endoteliales humanas cultivadas. Se produce el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Este efecto es aún más claro con una mayor cantidad de 250 ng/ml de neumolisina.

40 Como se muestra en la Figura 3C, la resistencia eléctrica disminuye con la adición de 125 ng/ml de neumolisina a células endoteliales humanas cultivadas. Se produce el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Sin embargo, la hiperpermeabilidad provocada por la adición de la toxina neumolisina se inhibe mediante una adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1.

45 Como se muestra en la Figura 3D, la resistencia eléctrica disminuye con la adición de 500 ng/ml de listeriolisina a células endoteliales humanas cultivadas. Se produce el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Sin embargo, la hiperpermeabilidad provocada por la adición de la toxina listeriolisina se inhibe mediante una adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1.

50 Como se muestra en la Figura 3E, la resistencia eléctrica disminuye con la adición de 1 µg/ml de listeriolisina a células endoteliales humanas cultivadas. Se produce el desarrollo de una hiperpermeabilidad. Sin embargo, la hiperpermeabilidad provocada por la adición de la toxina listeriolisina se inhibe mediante una adición de 50 µg/ml de

péptido SEQ ID No. 1.

Ejemplo 4: Inhibición de la fosforilación de la cadena ligera de miosina por el péptido SEQ ID No. 1

Materiales

5 Las células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se adquirieron de la empresa Lonza.

Las toxinas microbianas de listeriolisina (LLO) y neumolisina (PLY) se adquirieron de la Universidad de Giessen.

Cultivo celular

Las células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se cultivaron de manera habitual en el laboratorio.

10 Determinación de la fosforilación de la cadena ligera de miosina

Para determinar la fosforilación de la cadena ligera de miosina, y la influencia del péptido SEQ ID No. 1 sobre la fosforilación, se lavaron las células endoteliales humanas de los pulmones lavadas previamente con tampón fosfato pH 7,4 que contenía ortovanadato 1 mM. El contenido celular se lisó mediante incubación de las células con una solución de tampón Tris 20 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM mol/l, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, Triton X-100 al 1%, pirofosfato de sodio 2,5 mM, beta-glicerofosfato 1 mM, vanadato de sodio 1 mM, leupeptina 1 µg/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM. Adicionalmente, las células se descompusieron mediante ultrasonidos. El lisado celular se centrifugó para obtener los constituyentes solubles. El lisado celular soluble se aplicó a continuación de manera habitual en el laboratorio a una electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato de sodio desnaturizante y las proteínas se separaron de manera correspondiente a su masa. Después se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa. Las transferencias de proteína se trataron de manera habitual en el laboratorio con una solución de Tween 20 al 0,1% y leche en polvo seca al 5% durante 1 hora. A continuación se incubaron las transferencias de proteína con anticuerpos que están dirigidos contra la cadena ligera de miosina, o que están dirigidos contra la cadena ligera de miosina fosforilada.

25 Para hacer visible la cadena ligera de miosina o la cadena ligera de miosina fosforilada, los anticuerpos se hicieron visibles en una película de diagnóstico usando quimioluminiscencia de manera habitual en el laboratorio. Se determinó la intensidad de señal mediante densitometría, y se determinó la relación de cadena ligera de miosina con respecto a cadena ligera de miosina fosforilada.

30 Como se muestra en la Figura 4A, una adición de la toxina 125 ng/ml de listeriolisina a células pulmonares endoteliales humanas, lleva a un aumento del contenido relativo en cadena ligera de miosina fosforilada. Este efecto se refuerza aún por una concentración de toxina de 250 ng/ml de listeriolisina.

Como se muestra en la Figura 4B, una adición de la toxina 62,5 ng/ml neumolisina a células pulmonares endoteliales humanas, lleva a un aumento del contenido relativo en cadena ligera de miosina fosforilada. Este efecto se refuerza aún por una concentración de toxina de 125 ng/ml de neumolisina.

35 Como se muestra en la Figura 4C, una adición de la toxina 125 ng/ml de listeriolisina a células pulmonares endoteliales humanas, lleva a un aumento del contenido relativo en cadena ligera de miosina fosforilada. Una adición de 50 µg/ml del péptido SEQ ID No. 1 no tiene influencia alguna sobre el contenido de cadena ligera de miosina fosforilada. El aumento del contenido en cadena ligera de miosina fosforilada por 250 ng/ml de toxina listeriolisina se inhibe mediante una adición de 50 µg de péptido SEQ ID No. 1. Un péptido SEQ ID No. 3 no tiene influencia alguna sobre el aumento del contenido en cadena ligera de miosina fosforilada mediado por la toxina listeriolisina.

45 Como se muestra en la Figura 4D, una adición de la toxina 125 ng/ml de neumolisina a células pulmonares endoteliales humanas, lleva a un aumento del contenido relativo en cadena ligera de miosina fosforilada. Una adición de 50 µg/ml del péptido SEQ ID No. 1 no tiene influencia alguna sobre el contenido de la cadena ligera de miosina fosforilada. El aumento del contenido en cadena ligera de miosina fosforilada en 125 ng/ml de toxina neumolisina se inhibe por una adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1. Un péptido SEQ ID No. 3 no tiene influencia alguna sobre el aumento del contenido en cadena ligera de miosina fosforilada mediado por la toxina neumolisina.

La diferencia entre péptido SEQ ID No. 3 y péptido SEQ ID No. 1 consiste en que los aminoácidos Thr(6), Glu(8), Glu(11) del péptido SEQ ID No. 1 se encuentran en Ala(6), Ala(8) y Ala(11) en el péptido SEQ ID No. 3.

50 **Ejemplo 5: Influencia del péptido SEQ ID No. 1 sobre la hiperpermeabilidad y los daños pulmonares agudos en el modelo animal**

Inducción de la hiperpermeabilidad en ratones

Ratones de laboratorio se trataron intratraquealmente con una mezcla de isofurano/oxígeno antes de la preparación de los pulmones, así como con 100 µl por ratón de una mezcla de quetamina/rompun (1,33:1). Después de la anestesia, se implantó un catéter venoso en los ratones. Para la inducción de una hiperpermeabilidad del pulmón, se nebulizaron a continuación 25 µl de líquido en los pulmones con una jeringa fina. El líquido contenía el 0,9% de solución salina o 250 ng de toxina neumolisina o 250 ng/ml de neumolisina/50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 1.

Visualización de la hiperpermeabilidad mediante azul de Evans

5,5 horas después de la administración de la toxina neumolisina, se administró a los ratones intravenosamente azul de Evans, disuelto en solución salina al 0,9%, a 100 mg/kg de peso del ratón. Después de 30 minutos, se extrajo la sangre de los animales por medio de punción del corazón. A continuación, se extrajeron los pulmones, se lavaron con 1 ml de EDTA-tampón fosfato (pH 7,4) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Para la determinación del contenido en colorante de azul de Evans en el tejido pulmonar, los pulmones después se homogeneizaron en tampón fosfato frío (1 ml de tampón por 100 mg de pulmón), se incubaron con solución de formalina durante 18 horas, y se centrifugaron (5.000 x g, 30 minutos). En el sobrenadante líquido, después se determinaron fotométricamente las absorciones a 620 nm y a 740 nm. El contenido en colorante de azul de Evans en el tejido pulmonar se determinó basándose en una curva de referencia para el colorante de azul de Evans disuelto en solución de formalina, y descontando el contenido en pigmentos de hemoglobina. La descarga del colorante azul de Evans de los capilares al tejido pulmonar debido a la hiperpermeabilidad inducida por medio de la toxina neumolisina, se comparó con la cantidad de colorante en el suero sanguíneo.

Como se muestra en la Figura 5A, una administración intratraqueal de la toxina neumolisina con una dosis de 250 ng y 500 ng por ratón lleva a una hiperpermeabilidad, determinada porque el colorante azul de Evans pasa sangre de los capilares pulmonares al tejido pulmonar, y puede detectarse en el tejido pulmonar.

Como se muestra en la Figura 5B, una administración intratraqueal de la toxina neumolisina con una dosis de 250 ng por ratón lleva a una hiperpermeabilidad, determinada porque el colorante Evans pasa sangre de los capilares pulmonares al tejido pulmonar, y puede detectarse en el tejido pulmonar. Mediante la administración intratraqueal de 50 µg de péptido SEQ ID No. 1 se produce la inhibición del desarrollo de la hiperpermeabilidad debido a toxina.

Como se muestra en la Figura 5C, una administración intratraqueal de la toxina neumolisina con una dosis de 250 ng por ratón, debido a la manifestación de una hiperpermeabilidad, lleva a un número elevado de leucocitos en el líquido broncoalveolar de los pulmones en ratones. Mediante la administración intratraqueal de 50 µg de péptido SEQ ID No. 1 se produce la inhibición del desarrollo de la hiperpermeabilidad debido a toxina y una clara disminución del número de leucocitos en el líquido broncoalveolar en los pulmones de ratones.

Ejemplo 6: Inhibición de la activación de la proteína quinasa C por el péptido de la SEQ ID No. 1

Materiales

Las células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se adquirieron de la empresa Lonza.

La toxina microbiana neumolisina (PLY) se adquirió de la Universidad de Giessen.

Cultivo celular

Células endoteliales humanas del pulmón, aisladas de capilares del pulmón, se cultivaron de manera habitual en el laboratorio. Durante el cultivo celular se añadió la toxina neumolisina con una concentración de 250 ng/ml, o la toxina neumolisina con una concentración de 250 ng/ml y el péptido SEQ ID No. 1 con una concentración de 50 µg/ml.

Determinación del contenido en proteína quinasa C alfa activada

El contenido de la proteína quinasa C alfa activada se determinó mediante medición de ELISA con el uso de un anticuerpo dirigido contra la proteína quinasa C alfa activada (fosfotreonina 638 proteína quinasa C alfa). Al mismo tiempo se determinó el contenido total en proteína quinasa C alfa por medio de ensayo de ELISA comercialmente disponible.

Como se muestra en la Figura 6 muestra, mediante la acción de la toxina neumolisina se produce un fuerte aumento del contenido en proteína quinasa C alfa activada en comparación con la concentración total de proteína quinasa C alfa. Mediante la adición de péptido SEQ ID No. 1 se produce una inhibición de la activación de la proteína quinasa C alfa.

Ejemplo 7: Aumento de la expresión del canal de sodio epitelial (ENaC) en células epiteliales por el péptido SEQ ID No. 1

Materiales

Las células epiteliales humanas del pulmón tipo H441 se adquirieron de la empresa ATTC.

Cultivo celular

5 Células epiteliales del pulmón tipo H441 se cultivaron de manera habitual en el laboratorio en un medio RPMI 1640 comercial con los aditivos L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1,5 g/l, glucosa 4,5 g/l, tampón HEPES 10 mM pH 7,4, suero bovino al 10%.

Detección de la expresión del canal de sodio epitelial

En las células epiteliales cultivadas se determinó la expresión del canal de sodio (ENaC) por medio de "PCR en tiempo real". Estos exámenes tuvieron lugar en células sin y con adición de 50 ug/ml de péptido SEQ ID No. 1, así como después de la adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3.

10 Como se muestra en el examen 7, mediante adición de 50 ug/ml de péptido SEQ ID No. 1 a células epiteliales del pulmón se produce una triplicación de la expresión del canal de sodio ENaC.

Mediante una adición de 50 µg/ml de péptido SEQ ID No. 3 no se produce un aumento sustancial de la expresión del canal de sodio ENaC.

15 La diferencia entre péptido SEQ ID No. 3 y péptido SEQ ID No. 1 consiste en que los aminoácidos Thr(6), Glu(8), Glu(11) del péptido SEQ ID No. 1 se encuentran en Ala(6), Ala(8) y Ala(11) en el péptido SEQ ID No. 3.

Ejemplo 8: Efecto del péptido SEQ ID No. 1 sobre la evolución de la enfermedad de ratones con infección pulmonar vírica

Se examinaron los siguientes grupos de estudio de animales en cuanto al efecto del péptido SEQ ID No. 1 sobre una infección pulmonar vírica:

20 Grupo 1. Control negativo (PBS por vía nasal).
Grupo 2. Control positivo (infección con aproximadamente 2.000 unidades de virus influenza A por vía nasal).
Grupo 3. Grupo de prueba (infección con aproximadamente 2.000 unidades de virus influenza A por vía nasal, así como administración intratraqueal de 10 µg de péptido SEQ ID No. 1).

Se usaron 6 ratones BALB/c por cada grupo. Se procedió de acuerdo con el siguiente esquema de tratamiento:

25 Día de tratamiento 0:

Grupo 1: administración de PBS por vía nasal.
Grupo 2: infección de los ratones con virus de influenza A por vía nasal.
Grupo 3: infección de los ratones con virus de influenza A por vía nasal y péptido SEQ ID No. 1.

Días de tratamiento 0, 2, 4, 6, 8:

30 Grupo 1: administración intratraqueal de PBS.
Grupo 2: administración intratraqueal de PBS.
Grupo 3: administración intratraqueal de péptido SEQ ID No. 1.

Días de tratamiento 0 a 10:

35 Observación diaria de temperatura corporal, peso corporal y tasa de supervivencia de los animales de prueba.

Los exámenes dieron como resultado que los animales de prueba con infección pulmonar vírica (Grupo 2), en el plazo de 10 días, perdieron aproximadamente el 20% de su peso corporal.

Por el contrario el peso corporal de los animales de prueba se redujo en solo aproximadamente un 10%, cuando se administró el péptido SEQ ID No. 1 (Grupo 3).

40 Los resultados están representados en la Figura 8.

Los exámenes dieron como resultado además que en el caso de animales de prueba con infección pulmonar vírica (Grupo 2), después de 7 días, la temperatura corporal bajaba de 37,5 °C a 33 °C. A continuación, la temperatura corporal aumentaba hasta 35 °C.

45 Por el contrario, en el caso de animales de prueba con administración del péptido SEQ ID No. 1 (Grupo 3), después de 7 días, bajó solo hasta 35 °C. A continuación la temperatura corporal aumentaba de nuevo hasta 37 °C.

Los resultados están representados en la Figura 9.

Los exámenes dieron como resultado además que 10 días después de la infección pulmonar vírica, habían muerto 2/3 de los animales de prueba del Grupo 2.

Por el contrario, en el caso de la administración de péptido SEQ ID No. 1 (Grupo 3), la mortalidad de los animales de prueba después de 10 días era de solo 1/3.

5 Los resultados están representados en la Figura 10.

En conjunto, los exámenes en animales de prueba con infección pulmonar vírica muestran que la administración del péptido SEQ ID No. 1 reduce tanto la bajada del peso corporal, aminora la disminución de la temperatura corporal y lleva a una tasa de supervivencia claramente elevada.

10 **Ejemplo 9: Aplicación del péptido SEQ ID No. 1 ("AP301") en un modelo de animal grande con SDRA inducido por lavado**

15 **Materiales y métodos:** Con el consentimiento de la comisión protectora de animales competente, se indujo un daño pulmonar en dos cerdos (25 kg) bajo anestesia general por agotamiento del agente tensioactivo (4 veces de lavado broncoalveolar, 30 ml/kg de peso corporal cada uno). A continuación, se administró endotraquealmente 1 mg/kg de peso corporal de AP301 (péptido SEQ ID No. 1). El animal 1 (1) recibió una inyección traqueal profunda de la dosis global, en el caso del animal 2 (2), se realizó una nebulización de la misma dosificación a lo largo de 30 min. Posteriormente, tuvo lugar un periodo de ventilación de cinco horas. La presión parcial de oxígeno arterial (paO₂) se registró por medio de una sonda de medición en tiempo real, intraaórtica (FOXY, Ocean Optics, EE.UU.) validada de antemano. La espirometría y la hemodinámica se registraron permanentemente, así como las mediciones con la tecnología PiCCO realizada en intervalos de media hora.

20 **Resultados:** Durante la administración del medicamento no se mostró ningún efecto hemodinámico indeseado. Los ajustes de la ventilación se mantuvieron constantes en el intervalo no protector (P_{máx} 40 mbar, volumen tidal ≥ 10 ml/kg de peso corporal, PEEP ≤ 10 mbar, frecuencia 25-35/min) para evitar los efectos terapéuticos. En ambos animales se mostró una mejora limitada continuamente a aproximadamente 1,5 horas de la oxigenación con un aumento de paO₂ de, como máximo, 162,8 mmHg (1) o 224,6 mmHg (2). Con la nebulización de AP301, esto
25 presentó un retraso temporal en comparación con la administración traqueal profunda, sin embargo, era más marcado. En paralelo a la mejora del intercambio de gases, pudo registrarse una reducción del agua pulmonar extravascular en un 15,8-52,5% con respecto al valor inicial después del agotamiento del agente tensioactivo.

30 Estos resultados muestran de forma espectacular que el nuevo planteamiento de acción farmacológico de acuerdo con la invención demuestra ser eficiente en el tratamiento del SDRA también en el modelo de animal grande aceptado para el tratamiento de SDRA.

Resumen de las secuencias:

- SEQ ID No. 1 CGQRETPEGAEAKPWYC
- SEQ ID No. 2 KSPGGQRETPEGAEAKPWYE
- SEQ ID No. 3 CGQREAPAGAAAKPWYC
- 35 SEQ ID No. 4 TPEGAE
- SEQ ID No. 5 QRETPEGAEAKPWY
- SEQ ID No. 6 PKDTPEGAEAKPWY
- SEQ ID No. 7 CGPKDTPEGAEAKPWYC
- SEQ ID No. 8 CGQKETPEGAEAKPWYC
- 40 SEQ ID No. 9 CGQRETPEGAEAKPWYC
- SEQ ID No. 10 CGQRETPEGAEAKPC
- SEQ ID No. 11 CQRETPEGAEAKPWYC
- SEQ ID No. 12 CGQRETPEGAEAKFWYC

LISTADO DE SECUENCIAS

- 45 <110> Apeptico Forschung und Entwicklung GmbH
- <120> Procedimiento para la prevención y para el tratamiento de una hiperpermeabilidad
- 50 <130> R 55450
- <150> A 359/2009
- <151> 05-03-2009
- 55 <160> 12
- <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 657 445 T3

5 <210> 1
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 1
 Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp
 1 5 10 15
 Cys
 15 <210> 2
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido sintético
 20 <400> 2
 Lys Ser Pro Gly Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys
 1 5 10 15
 Pro Trp Tyr Glu
 20
 25 <210> 3
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 30 <220>
 <223> Péptido sintético
 <400> 3
 Cys Gly Gln Arg Glu Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ala Lys Pro Trp Tyr
 1 5 10 15
 Cys
 35 <210> 4
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Péptido sintético
 45 <400> 4
 Thr Pro Glu Gly Ala Glu
 1 5
 50 <210> 5
 <211> 14

ES 2 657 445 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5
<220>
<223> Péptido sintético

<400> 5

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

10
<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15
<220>
<223> Péptido sintético

20
<400> 6

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

25
<210> 7
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30
<220>
<223> Péptido sintético

<400> 7

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

Cys

35
<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40
<220>
<223> Péptido sintético

<400> 8

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

Cys

45
<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50
<220>

ES 2 657 445 T3

<223> Péptido sintético

<400> 9

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

5

Cys

<210> 10

<211> 15

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15

<400> 10

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

20

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<400> 11

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

30

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

40

<400> 12

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

Cys

REIVINDICACIONES

- 5 1. Péptido, que se compone de 7-17 aminoácidos adyacentes y que comprende el hexámero TX₁EX₂X₃E, en donde X₁, X₂ y X₃ pueden ser cualquier aminoácido natural o no natural, en donde el péptido no presenta actividad de unión de receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.
2. Péptido, que se compone de 7-17 aminoácidos adyacentes y que comprende el hexámero TPEGAE, en donde el péptido no presenta actividad de unión de receptor de TNF y está ciclado, para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.
- 10 3. Péptido ciclado, que se compone de una secuencia de aminoácidos consecutivos seleccionada del grupo que consiste en
- QRETPEGAEAKPWY
 - PKDTPEGAEAKPWY
 - CGQRETPEGAEAKPWYC y
 - CGPKDTPEGAEAKPWYC
- 15 y fragmentos de al menos 7 aminoácidos de la misma, fragmentos que presentan el hexámero TPEGAE, para la producción de un medicamento para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial.
- 20 4. Péptido, tal como se define en una de las reivindicaciones 1 a 3, para la aplicación para la prevención de edemas en el tratamiento de neumonía, lesión pulmonar aguda, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA) o enfermedades pulmonares bacterianas o víricas, en particular infecciones con *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, virus del SRAG, VRS o virus influenza.
5. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado porque** comprende la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC y está ciclado a través de los residuos C.
- 25 6. Péptido para la aplicación de acuerdo con la reivindicación 5, **caracterizado porque** está ciclado a través de un puente disulfuro entre los residuos C.
7. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para proteger células epiteliales y células endoteliales frente a hiperpermeabilidad, desencadenada por moléculas de oxígeno reactivas.
- 30 8. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para proteger células epiteliales y células endoteliales frente a hiperpermeabilidad, desencadenada por toxinas bacterianas.
9. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para inhibir la fosforilación de la cadena ligera de miosina.
- 35 10. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para inhibir la activación de la proteína quinasa C.
11. Péptido para la aplicación de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para aumentar la expresión del canal de sodio epitelial.
- 40 12. Péptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado porque** se usa para la prevención de edemas mediante disminución de una hiperpermeabilidad desencadenada por moléculas de oxígeno reactivas, toxinas microbianas, microorganismos Gram positivos o mediante ataque de virus pulmonar.
13. Composición farmacéutica para la aplicación para la prevención de edemas mediante disminución de la hiperpermeabilidad, basándose en lesiones de las capas endotelial y epitelial, que contiene un péptido de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 12 y un vehículo farmacéutico.

Figura 1A

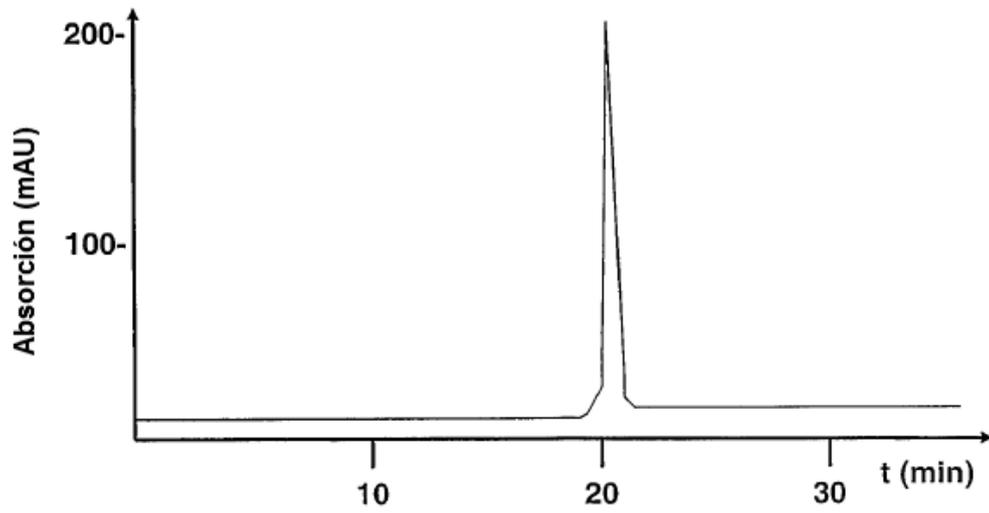


Figura 1B

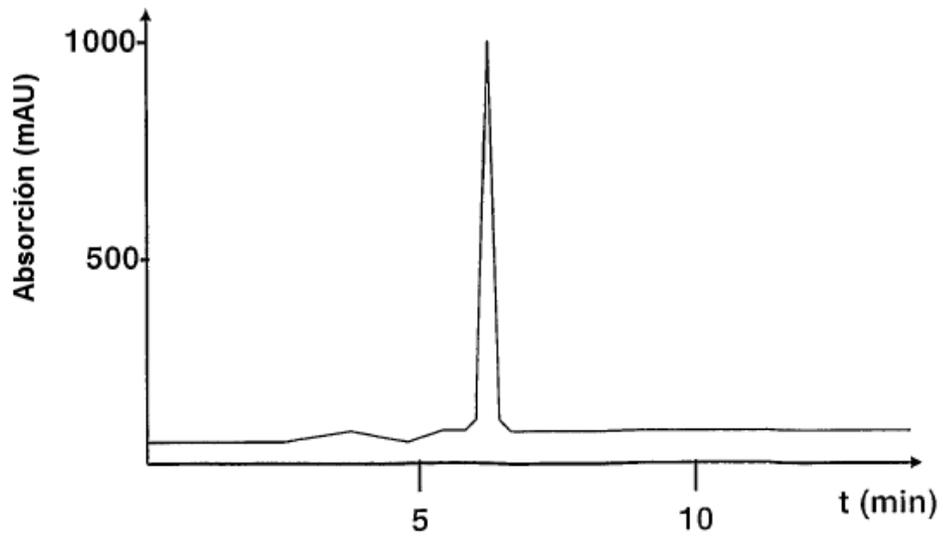


Figura 1C

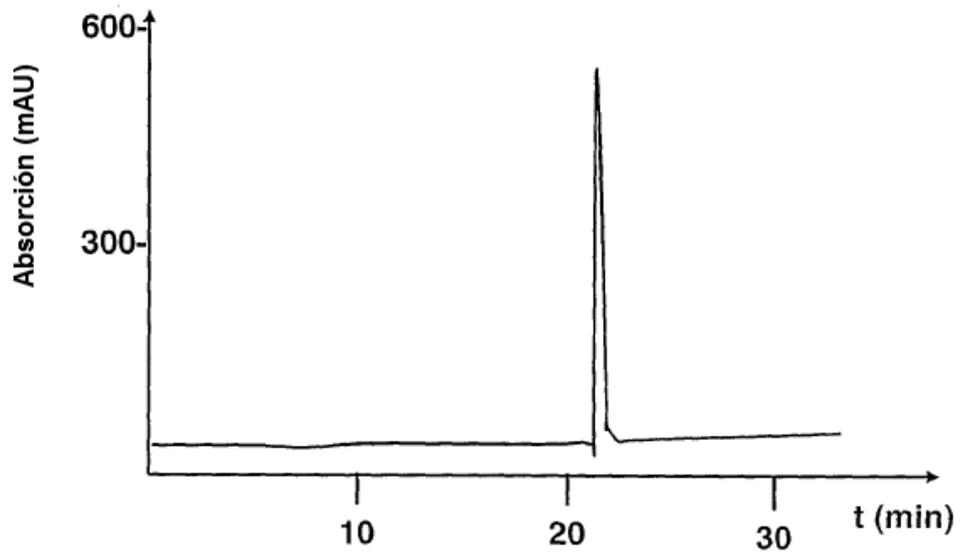


Figura 2A

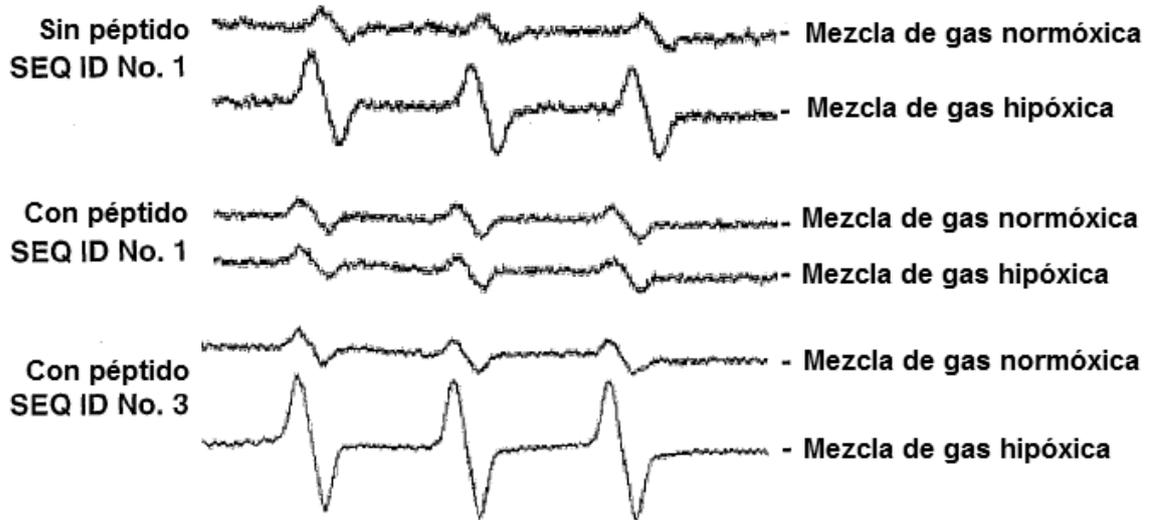


Figura 2B

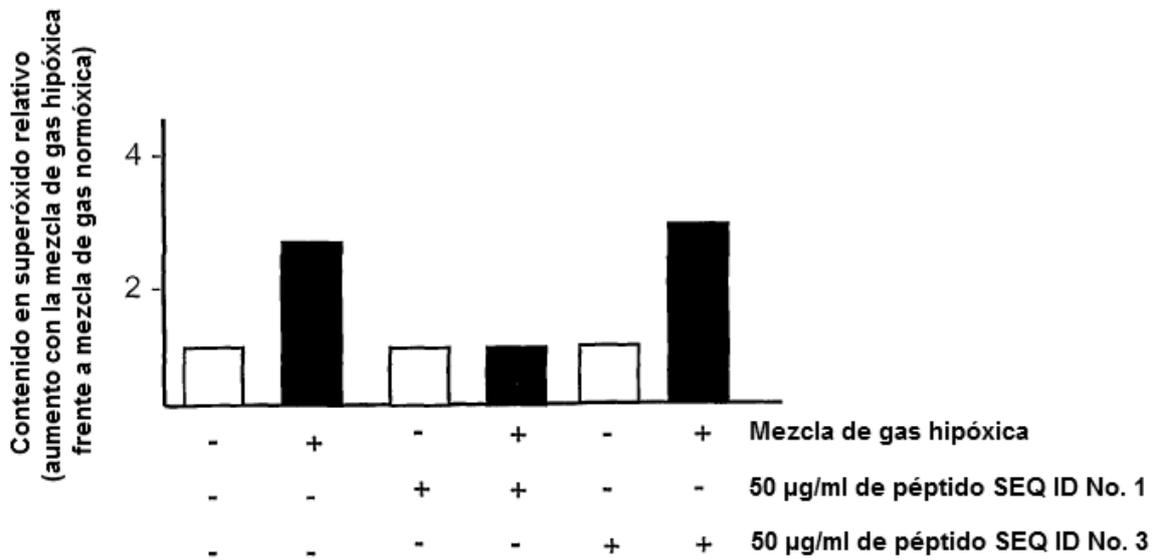


Figura 3A

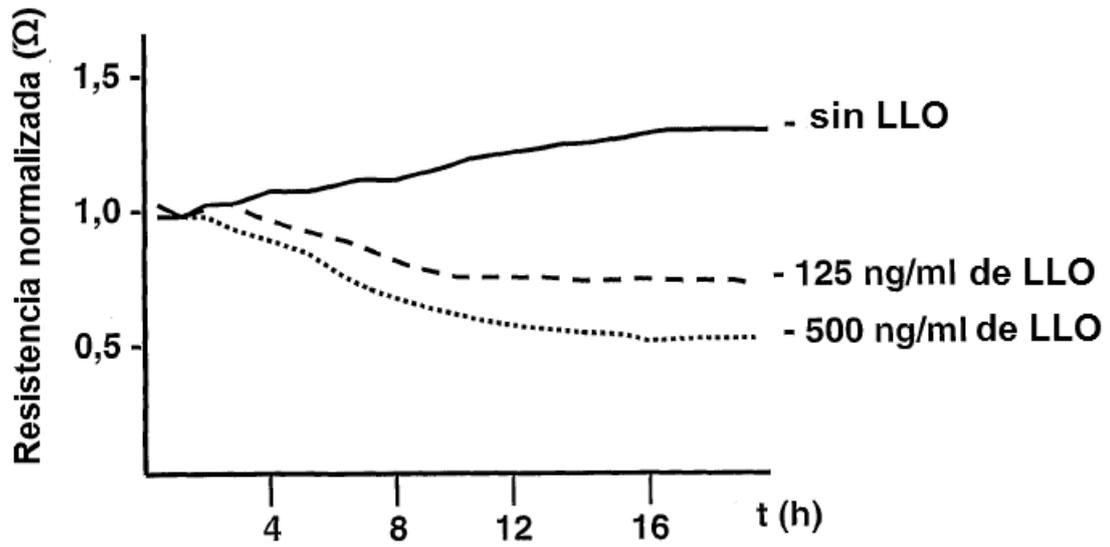


Figura 3B

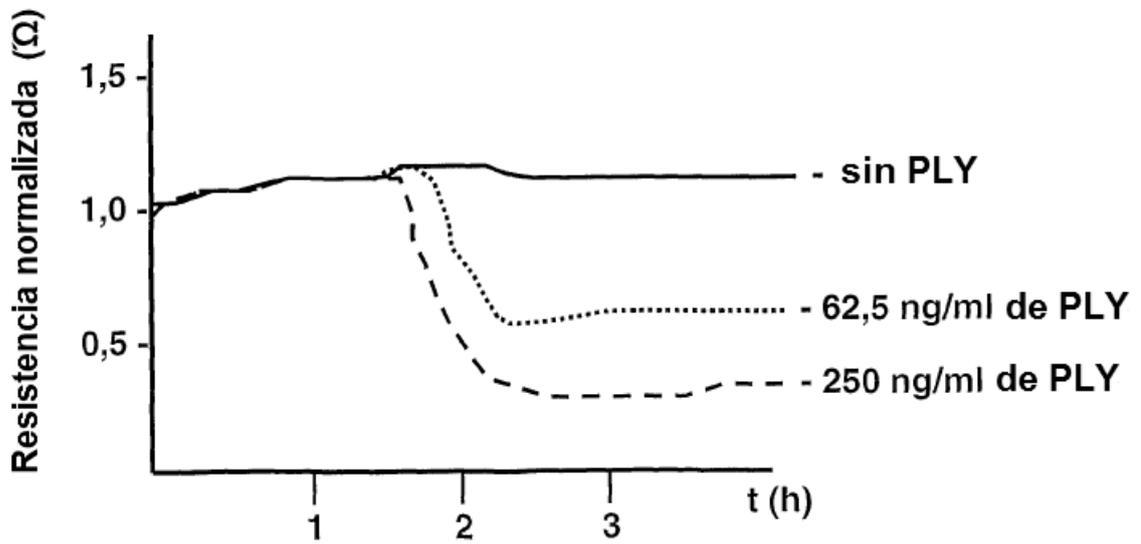


Figura 3C

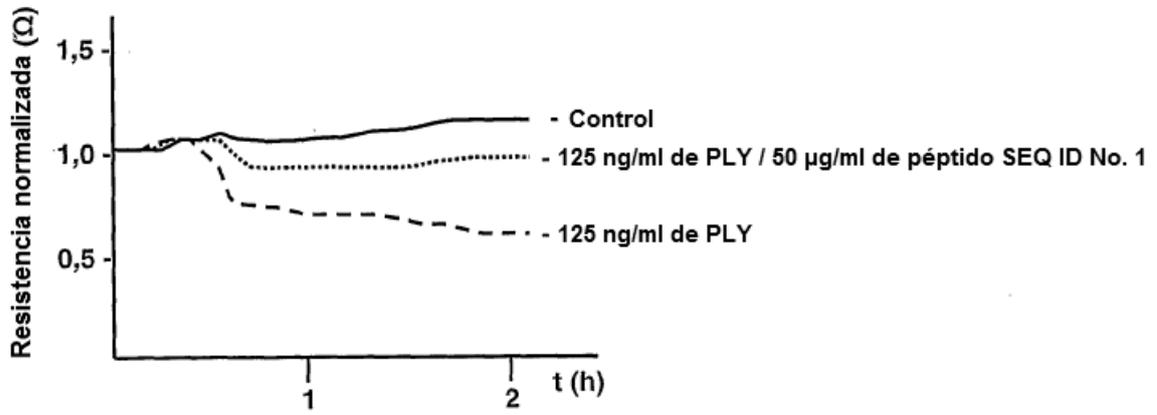


Figura 3D

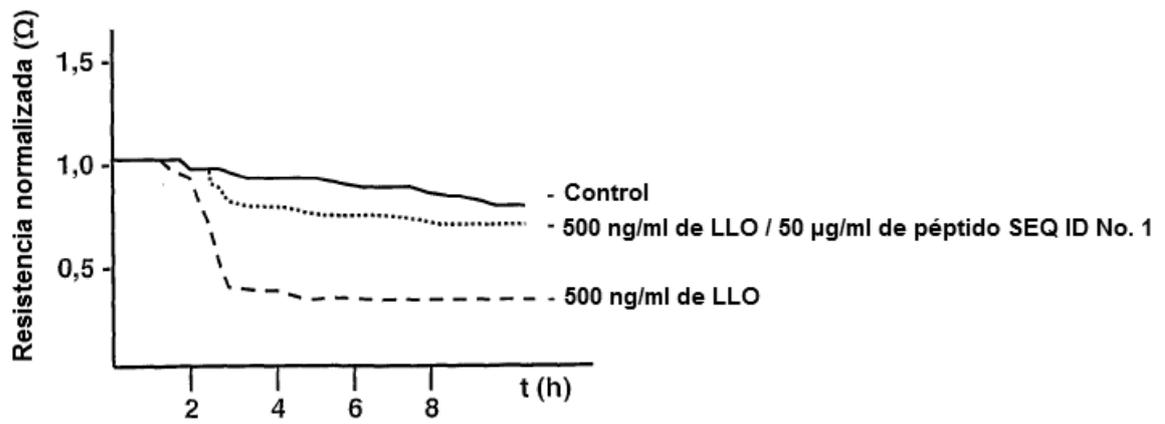


Figura 3E

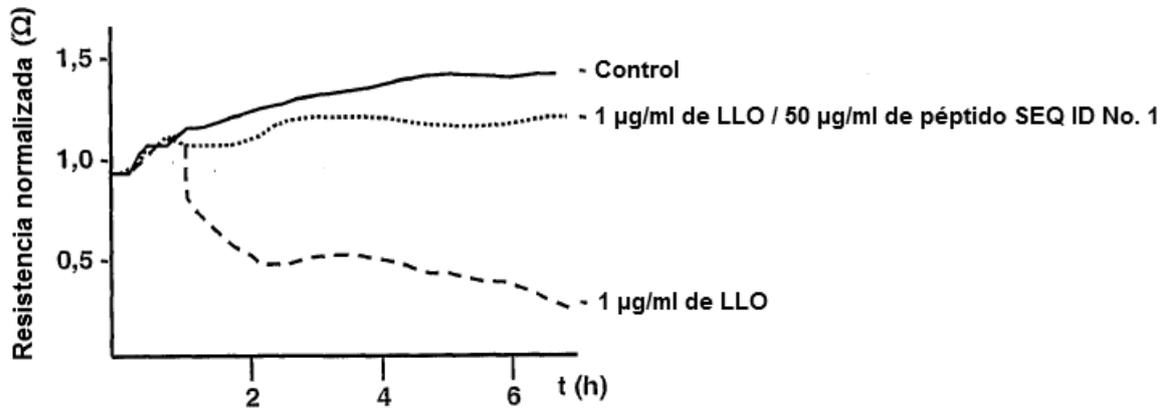


Figura 7

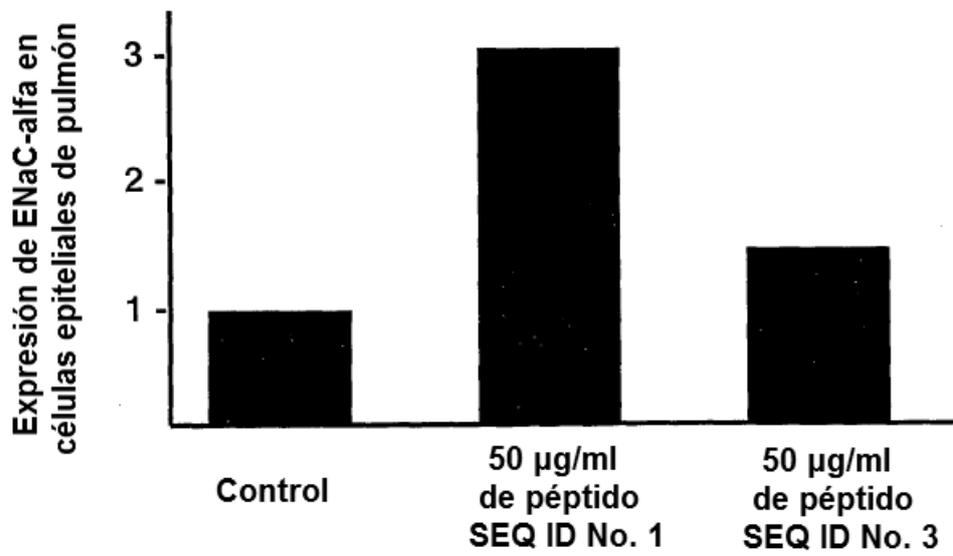


Figura 4A

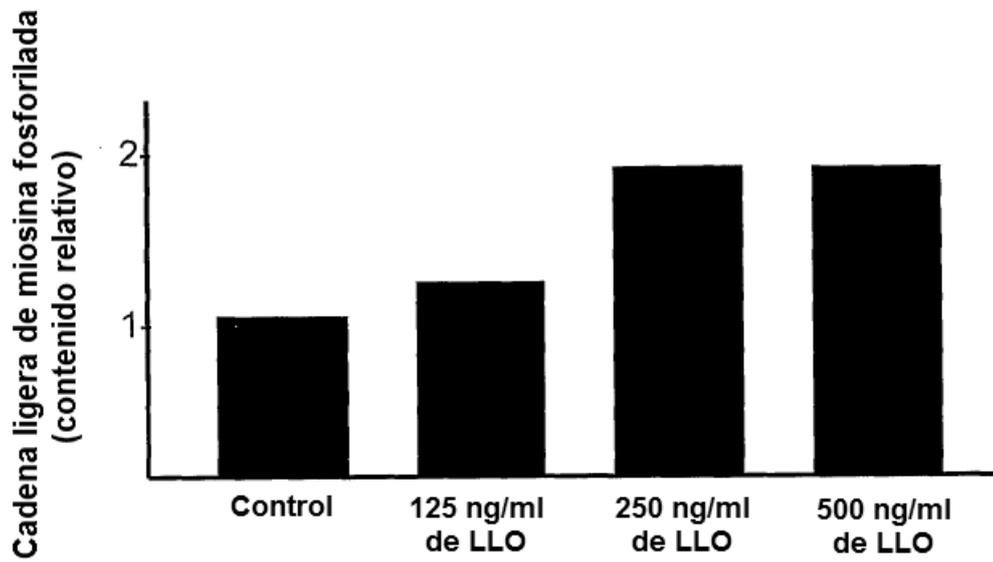


Figura 4B

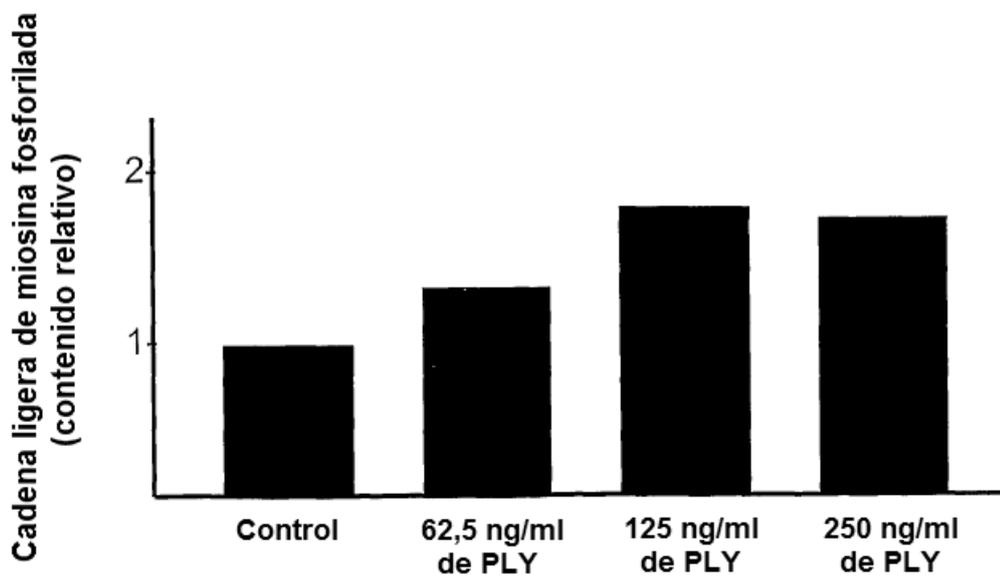


Figura 4C

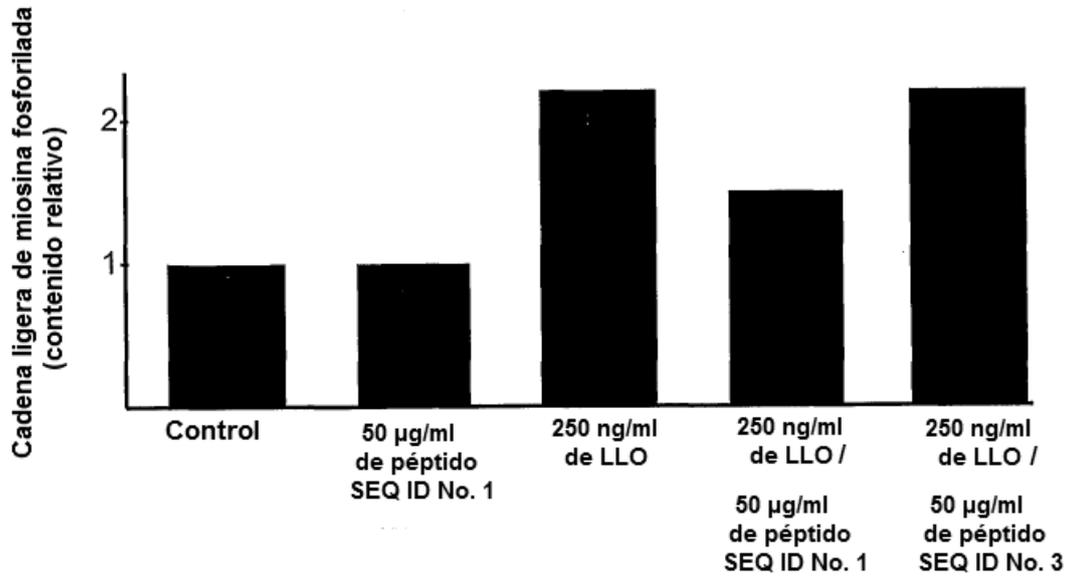


Figura 4D

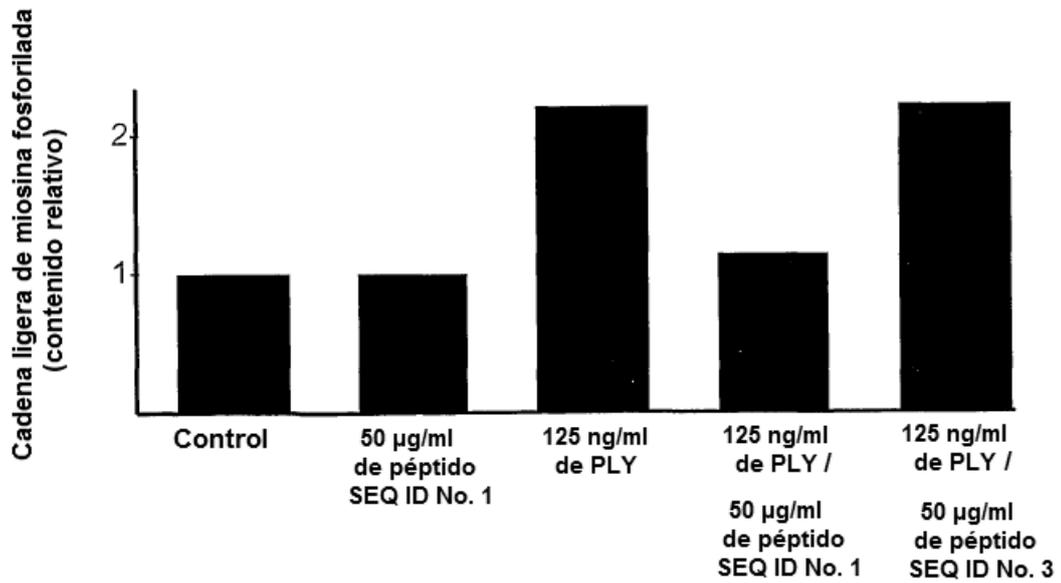


Figura 5A

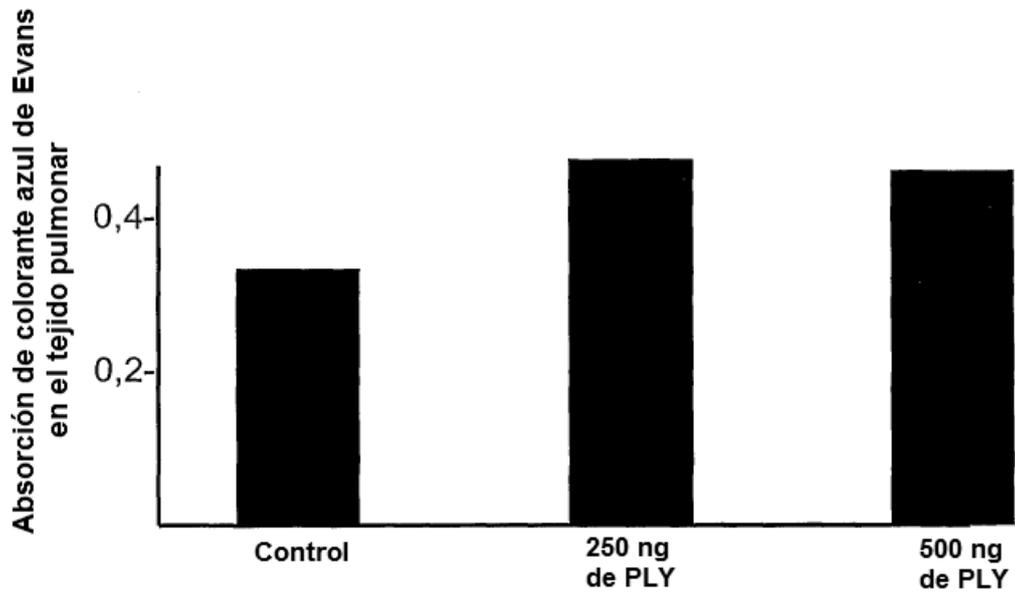


Figura 5B

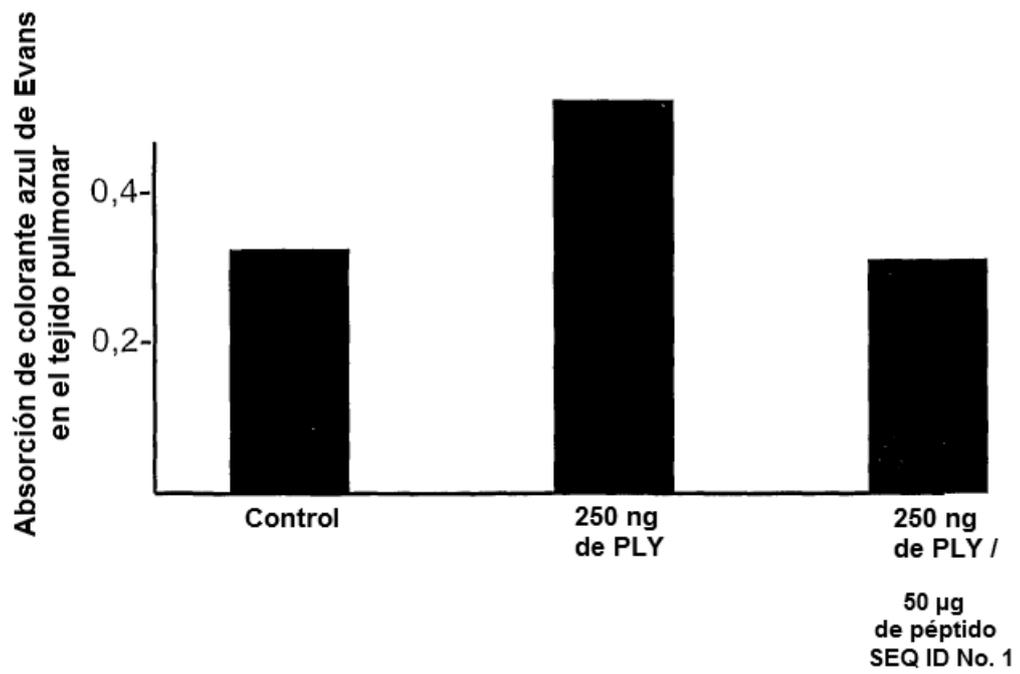


Figura 5C

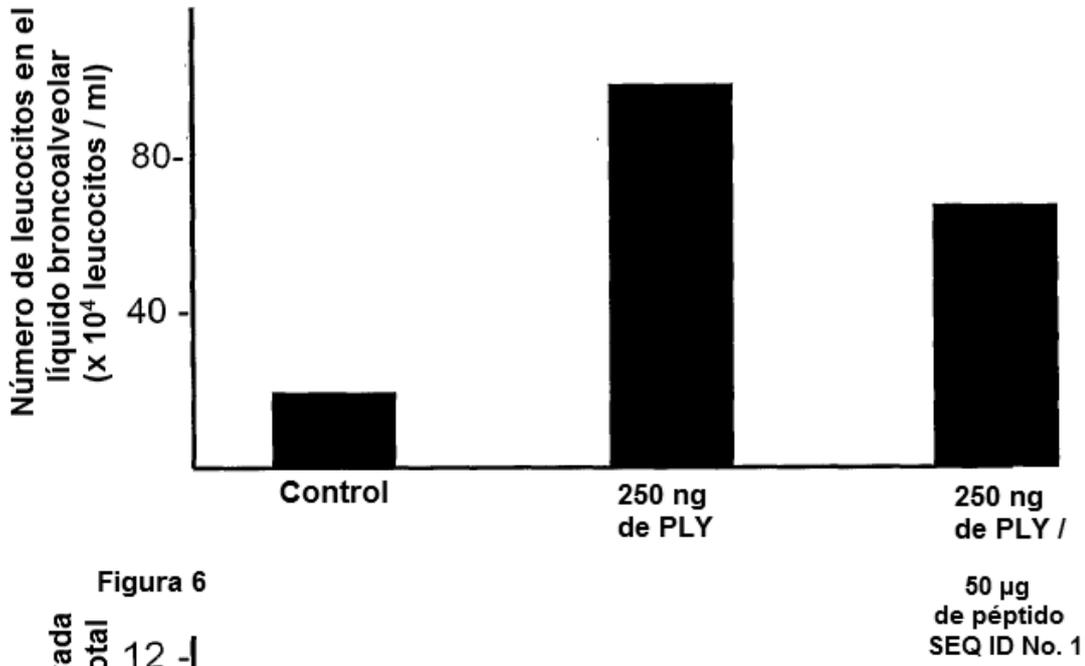


Figura 6

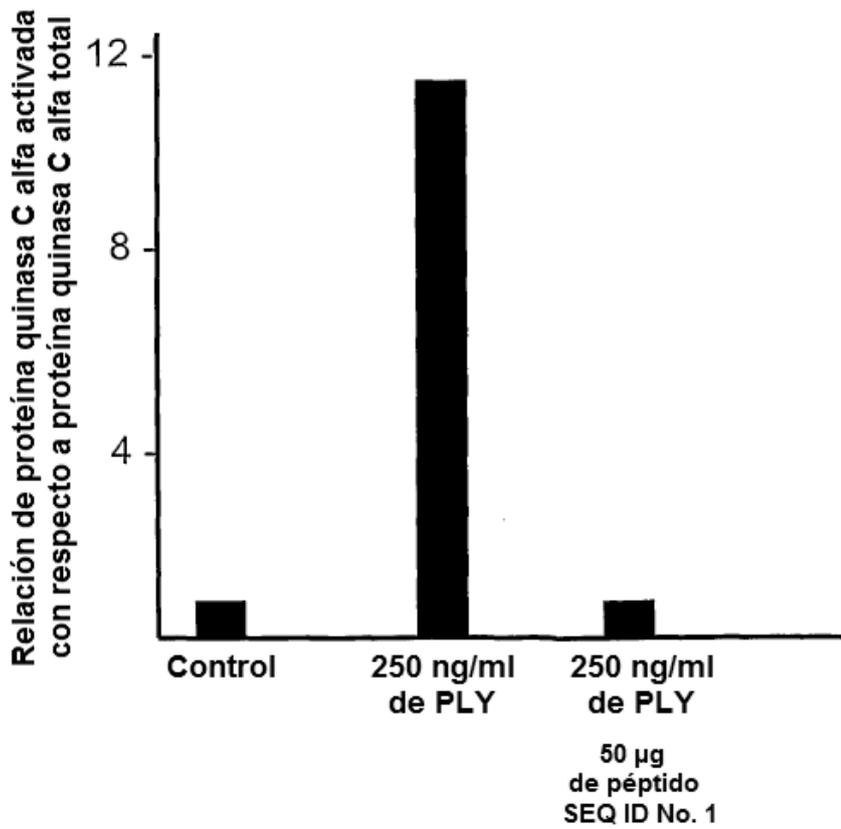


Figura 8

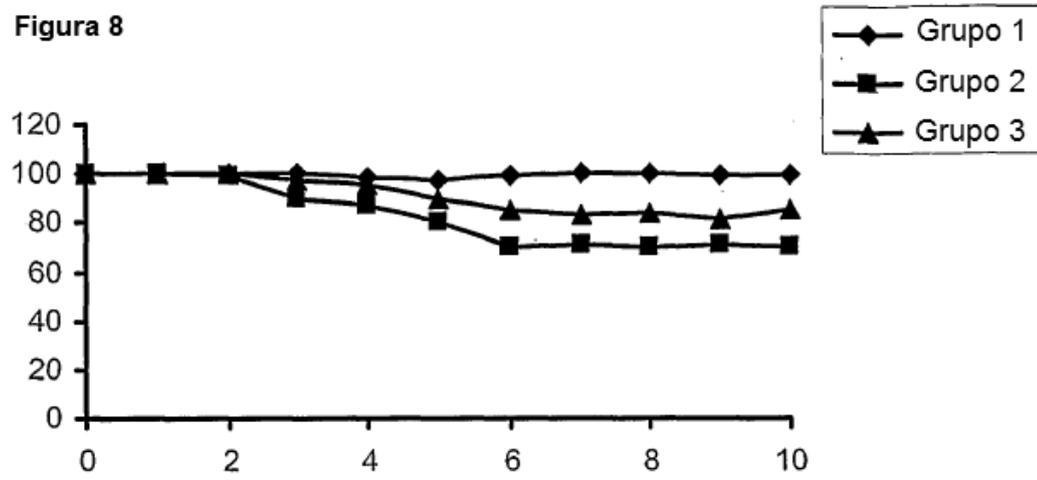


Figura 9

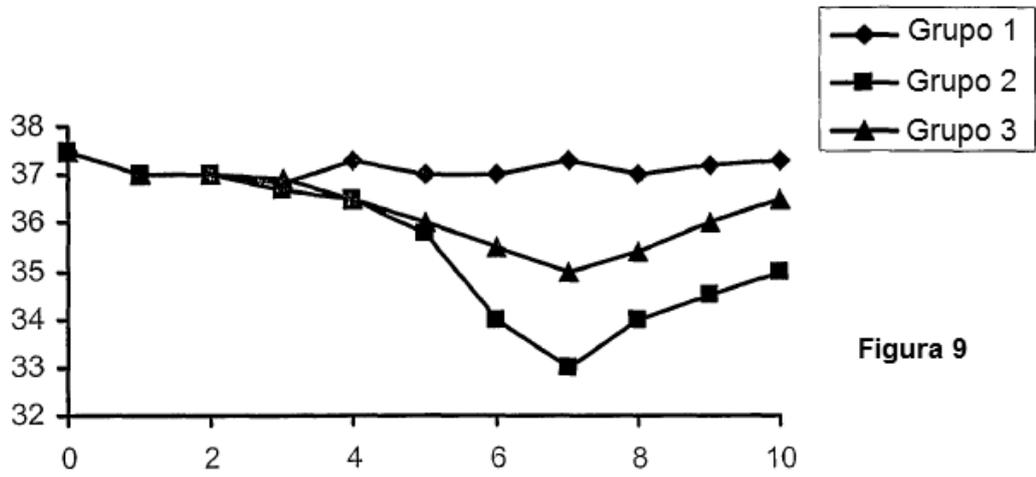


Figura 10

