(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 805 698**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/12 (2006.01)
C07K 7/56 (2006.01)
C07K 7/60 (2006.01)
A61P 5/40 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.09.2016 PCT/EP2016/071636**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **23.03.2017 WO17046124**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.09.2016 E 16766922 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.04.2020 EP 3349779**

(54) Título: **Polipéptido cíclico para el tratamiento de PHA tipo 1B**

(30) Prioridad:

14.09.2015 EP 15185093

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
15.02.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

WILLAM, ANITA;
LEMMENS-GRUBER, ROSA;
TZOTZOS, SUSAN, JANE;
FISCHER, BERNHARD;
SHABBIR, WAHEED y
LUCAS, RUDOLF

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 805 698 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

Polipéptido cíclico para el tratamiento de PHA tipo 1B

La presente invención se refiere a polipéptidos cíclicos y a su uso en el tratamiento de pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1 (PHA tipo 1B).

Antecedentes

El pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo (AR) tipo 1, (PHA tipo 1B) es una enfermedad rara y potencialmente mortal que se presenta en los primeros días de vida con retraso del crecimiento, pérdida de peso, pérdida de sal, hiperpotasemia y acidosis metabólica. El estado se caracterizó por primera vez en 1958 (Cheek & Perry, 1958). El pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1 es un estado potencialmente mortal en el que el canal de iones de sodio, ENaC, que se encuentra en los riñones, colon, glándulas salivales y sudoríparas y en el pulmón ha perdido la función de promover el movimiento del ion de sodio (ion Na+) a través de las capas celulares. La falta de función de ENaC da como resultado pérdida de sodio en la orina y las heces y un grave desequilibrio de sal en el cuerpo. Las características distintivas son niveles bajos de sodio (hiponatremia) y niveles altos de potasio (hiperpotasemia) en la sangre. El trastorno involucra múltiples sistemas de órganos y, por tanto, también se denomina PHA sistémico tipo 1 para distinguirlo del PHA autosómico dominante (AD) o renal tipo 1 más leve, en el que la pérdida de sal se limita principalmente al riñón y está provocada por mutaciones en un gen diferente (Riepe, 2009). La diferenciación entre el PHA renal y sistémico tipo 1 puede hacerse basándose en los requisitos de Na, la facilidad de manejo del desequilibrio electrolítico, los resultados de las pruebas de sudor y las pruebas genéticas (Amin *et al*, 2013). Concretamente, los niños con pseudohipoaldosteronismo sistémico, pero no renal, tienen enfermedades frecuentes de las vías respiratorias bajas de causa desconocida y a menudo se diagnostican erróneamente como que padecen fibrosis quística (Hanukoglu *et al*, 1994; Marthinsen *et al*, 1998; Huber *et al*, 2010).

Los recién nacidos diagnosticados por primera vez con PHA tipo 1B tienen valores de renina y aldosterona característicamente elevados, pero no pueden mantener la presión arterial. La evaluación de laboratorio de pacientes con PHA tipo 1B muestra actividad de la renina plasmática aumentada con altas concentraciones de aldosterona en suero e hiponatremia, así como la hiperpotasemia ya mencionada. El reemplazo agresivo de sal y el control de la hiperpotasemia son necesarios para garantizar la supervivencia.

El pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo I (PHA tipo 1B) está provocado por una mutación homocigótica o heterocigótica compuesta en cualquiera de los tres genes que codifican para las subunidades del canal de sodio epitelial (ENaC) (la subunidad alfa, la subunidad beta, la subunidad gamma).

Debido a mutaciones en uno cualquiera de los tres genes que codifican para las subunidades alfa, beta y gamma del canal de sodio epitelial (ENaC), la secuencia de aminoácidos de la proteína ENaC expresada mutante es incompleta o diferente del ENaC maduro (no mutante). El ENaC mutante está prácticamente inactivo y no promueve el transporte de iones de sodio a través de las células y las membranas.

La manifestación clínica del PHA sistémico tipo 1 se produce dentro del periodo neonatal con un diagnóstico generalmente basado en una concentración elevada de Na en el sudor y ausencia de diferencias de voltaje transepitelial nasal o rectal (Riepe, 2009). El fenotipo clínico es uno de pérdida de sal renal grave, hiperpotasemia, acidosis metabólica y niveles elevados de renina y aldosterona en plasma. Los niños que padecen PHA AR tipo 1 a menudo muestran complicaciones pulmonares como resultado de una absorción de líquido reducida dependiente de Na y un volumen aumentado de líquido de la superficie de las vías respiratorias (Kerem *et al*, 1999). El inicio de los síntomas respiratorios normalmente se produce en el plazo de semanas o meses desde el nacimiento, observándose frecuentemente rinorrea persistente, infecciones recurrentes de los oídos y sinusitis, congestión en el pecho, tos y taquipnea a menudo asociados con fiebre, sibilancias y crepitaciones. Durante estos episodios de enfermedad respiratoria, que pueden producirse varias veces al año, la radiografía de tórax del paciente puede mostrar engrosamiento peribronquial, atelectasia y/o pequeños infiltrados esponjosos (Thomas *et al*, 2002). Las complicaciones pulmonares ocasionalmente pueden resultar mortales (Sharma *et al*, 2013).

El pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo I es una enfermedad de por vida y muestra poca mejoría con el tiempo (Zennaro *et al*, 2004). Los pacientes que padecen PHA tipo 1B corren el riesgo de crisis potencialmente mortales de pérdida de sal, en combinación con hiperpotasemia y deshidratación graves a lo largo de toda su vida (Riepe, 2009).

Actualmente, el tratamiento del PHA tipo 1B se limita al manejo de líquidos y electrolitos. El tratamiento sintomático actual del PHA tipo 1B es una combinación de terapia agonista beta2 para reducir el exceso de líquido pulmonar y el reemplazo agresivo de sal y el control de la hiperpotasemia para restablecer el equilibrio electrolítico.

Breve descripción de la invención

Actualmente, no existe ninguna terapia basada en fármacos que restablezca o al menos aumente la capacidad de transporte de los iones Na^+ de ENaC con pérdida de función mutante.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar una terapia basada en fármacos que restablezca la capacidad de transporte de los iones Na^+ de ENaC con pérdida de función mutante a nivel fisiológico.

Este objetivo se resuelve mediante un

polipéptido cíclico que comprende al menos seis aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1

Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr

para su uso en el tratamiento de pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1 (PHA tipo 1B) y para el restablecimiento de la capacidad de transporte de los iones Na^+ de ENaC con pérdida de función mutado.

Aunque actualmente no existe una terapia basada en fármacos que convierta ENaC mutante, prácticamente inactivo en ENaC fisiológicamente activo, se ha encontrado que los polipéptidos cíclicos según las invenciones restablecen la capacidad de transporte de los iones Na^+ y para compensar las mutaciones de aminoácidos de ENaC con pérdida de función mutante a niveles normales. Aunque los péptidos cíclicos tal como se detallan a continuación se han descrito para modular la actividad de ENaC de ENaC no mutante “normal” (activo silvestre), es sorprendente que los péptidos cíclicos también puedan compensar las mutaciones de aminoácidos y restablecer ENaC con pérdida de función mutante de nuevo a niveles normales.

En una realización preferida, el polipéptido cíclico comprende al menos nueve aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1.

Resultó que los polipéptidos cíclicos que comprenden la secuencia de aminoácidos

Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu (= SEQ ID NO: 5)

de SEQ ID NO: 1 muestran la unión más fuerte al receptor de ENaC. Por tanto, en una realización, se prefiere que los polipéptidos cíclicos comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5

Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu

de SEQ ID NO:1

En una realización, el polipéptido cíclico se caracteriza por la secuencia de aminoácidos

Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr.

Hay diferentes maneras de formar un anillo para proporcionar un polipéptido cíclico según la invención.

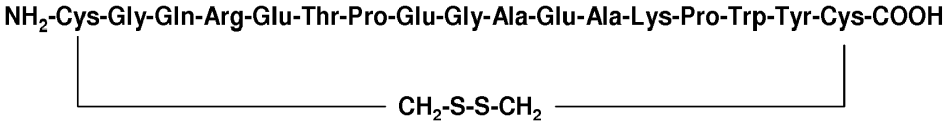
a) En una realización, el anillo cíclico se forma mediante enlaces amida en el polipéptido entre los aminoácidos individuales para formar un esqueleto peptídico y un enlace disulfuro entre dos aminoácidos cisteína para formar un anillo. Por tanto, una realización incluye un enlace disulfuro entre dos aminoácidos de cisteína.

En esa realización, el polipéptido comprende preferiblemente SEQ ID NO:2

Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys,

en la que el enlace disulfuro se forma entre Cys 1 y Cys 17 de SEQ ID NO:2.

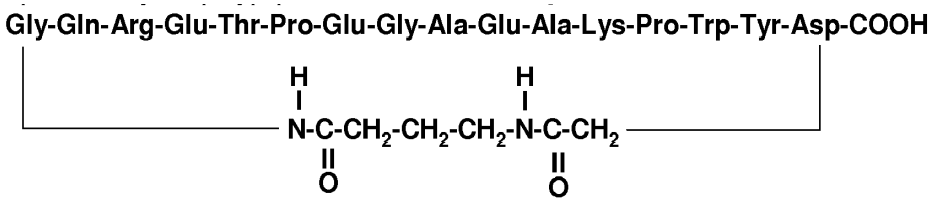
Un polipéptido cíclico preferido sería entonces SEQ ID NO:3



también denominado AP301.

b) En una realización, el anillo cíclico se forma mediante enlaces amida en el polipéptido entre los aminoácidos individuales para formar un polipéptido circular. En una realización, un anillo cíclico de este tipo incluye un aminoácido no natural tal como ácido γ-aminobutírico (GABA).

Un polipéptido cíclico preferido sería entonces SEQ ID NO:4



también denominado AP318.

Lo más preferiblemente en todas las realizaciones mencionadas anteriormente, el polipéptido cíclico se caracteriza porque el anillo cíclico comprende al menos 10, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a una composición farmacéutica que comprende un polipéptido cíclico tal como se mencionó anteriormente.

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que contiene el péptido cíclico según la presente invención (o una mezcla de péptidos según la presente invención) y moléculas de portador farmacéutico. Esta composición farmacéutica se usa para el tratamiento de PHA tipo 1B.

El término “composición farmacéutica” se refiere a cualquier composición o preparación que contiene un péptido cíclico, tal como se definió anteriormente, que restablece la capacidad de transporte de los iones Na^+ de ENaC con pérdida de función mutante a niveles normales. En particular, la expresión “una composición farmacéutica” se refiere a una composición que comprende un péptido cíclico según la presente invención y a moléculas o excipiente de portadores farmacéuticamente aceptables (ambos términos se usan de manera intercambiable). Los portadores o excipientes adecuados son conocidos por el experto en la técnica, por ejemplo, solución salina, disolución de Ringer, disolución de dextrosa, tampones, disolución de Hank, compuestos formadores de vesículas, aceites fijos, oleato de etilo, dextrosa en solución salina, sustancias que potencian la isotonicidad y la estabilidad química, tampones y conservantes. Otros portadores adecuados incluyen cualquier portador que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos en el paciente que sean perjudiciales para el paciente. Ejemplos son proteínas bien tolerables, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácido glicólico), aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. Esta composición farmacéutica puede administrarse (como fármaco) mediante procedimientos apropiados conocidos por el experto. La vía de administración preferida es la inhalación pulmonar como aerosol o administración intravenosa. Para la administración parenteral, la composición farmacéutica de la presente invención se proporciona en forma de unidad de dosificación inyectable, por ejemplo, como una disolución, suspensión o emulsión, formulada junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente. La dosificación y el método de administración, sin embargo, dependen del paciente individual a tratar. En general, el péptido según la presente invención se administra a una dosis de entre 1 μg/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 10 μg/kg y 5 mg/kg, lo más preferiblemente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferiblemente, la composición se administrará como una dosificación de bolo intraperitoneal. También puede aplicarse infusión continua. En este caso, el péptido se administra a una dosis de 5 a 20 μg/kg/minuto, más preferiblemente una infusión de 7-15 μg/kg/minuto.

Para la inhalación pulmonar como aerosol, la composición farmacéutica de la presente invención se proporciona como polvo seco o preparación líquida en forma de unidad de dosificación adecuada, por ejemplo, como partículas de polvo seco preparadas por liofilización y/o secado por pulverización, como disolución, suspensión y emulsión, formuladas junto con los excipientes farmacéuticamente aceptables definidos anteriormente. Las partículas de aerosol adecuadas para inhalación pulmonar, o bien partículas de polvo seco o bien partículas de aerosol líquidas, tienen diámetros de partículas por debajo de 50 μm, más preferiblemente por debajo de 10 μm. Las partículas de polvo seco pueden inhalarse mediante inhaladores de polvo seco. Las partículas líquidas pueden inhalarse mediante nebulizadores. La dosificación y el método de administración para la inhalación pulmonar, sin embargo, dependen del paciente individual a tratar. En general, el péptido según la presente invención se administra a una dosis de entre 1 μg/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 10 μg/kg y 5 mg/kg, lo más preferiblemente entre 0,1 y 2 mg/kg. Preferiblemente, la composición se administrará como dosificaciones de inhalación repetidas. También puede aplicarse inhalación continua. En este caso, el péptido se administra a una dosis de 5 a 20 μg/kg/minuto, más preferiblemente de 7-15 μg/kg/minuto.

Un aspecto de la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente que padece pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1 (PHA tipo 1B) que comprende un péptido cíclico tal como se mencionó anteriormente.

El canal de iones de sodio epitelial sensible a amilorida (ENaC)

El ENaC funcionalmente activo generalmente se compone de una o dos subunidades alfa o delta junto con una unidad beta y una unidad gamma. Cada cadena de polipéptidos de ENaC se compone de extremos terminales $-NH_2$ y -COOH cortos ubicados a nivel intracelular y dos regiones transmembrana a cada lado de un gran dominio de

bucle extracelular.

El ENaC se ubica en la membrana apical de las células epiteliales polarizadas del pulmón, colon distal, nefrona distal, glándulas sudoríparas y salivales, y otros órganos y tejidos. En epitelios estrechos polarizados, ENaC es la etapa limitativa de la tasa para la absorción de los iones Na^+; la función de ENaC anómala perturba la homeostasis de agua y sal y el funcionamiento fisiológico de los órganos y tejidos en los que se produce (Garty y Palmer, 1997; Kellenberger y Schild, 2002). El transporte transepitelial de iones Na^+ a través de una célula puede describirse como un proceso de etapas, cuya fuerza impulsora se proporciona por el gran gradiente electroquímico para el ion Na^+ existente a través de la membrana apical. ENaC activo funcional media la entrada de iones Na^+ desde el lado apical de la membrana. Esta entrada apical de Na^+ a través de ENaC puede bloquearse mediante la aplicación de concentraciones submicromolares de amilorida.

En el pulmón de mamíferos, la regulación del transporte de iones Na+ es crucial para mantener un nivel óptimo de líquido de revestimiento alveolar necesario para un intercambio de gases eficaz (Eaton *et al*, 2009).

Las mutaciones dentro de los genes de ENaC o en las regiones reguladoras en el sentido 5' interrumpen la expresión normal de ENaC, lo que da como resultado disfunción y regulación aberrante del canal.

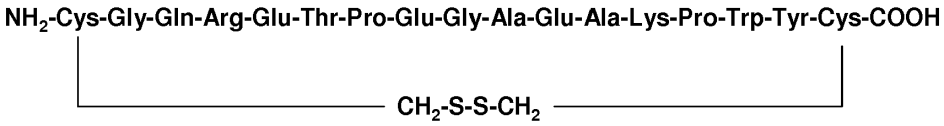
Los pacientes con PHA tipo 1B portan mutaciones con pérdida de función en la subunidad alfa de ENaC, observándose con menos frecuencia mutaciones en las subunidades beta y gamma.

El péptido AP301 original imita el dominio similar a lectina o TIP de TNF-alfa, correspondiente a los residuos C101-E116 de TNF humano silvestre (Lucas *et al*, 1994). En AP301, ciclo(CGQRETPEGAEAKPWYC), masa molecular promedio teórica 1923,1, C101 se ha reemplazado por glicina y E116 por cisteína, se añade una cisteína N-terminal y la secuencia de residuos de aminoácidos que representan el dominio similar a lectina se limita a una estructura cíclica a través de un enlace disulfuro entre las cadenas laterales de los residuos de cisteína terminales. La ciclación se logra mediante la oxidación de los residuos terminales de cisteína para formar un enlace disulfuro.

El AP318 ciclo(ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD), masa molecular promedio teórica 1901,0, es un péptido TIP en el que la ciclación se logra creando un enlace amida entre el grupo amino del ácido 4-aminobutanoico N-terminal y el grupo carboxilo de la cadena lateral unido al carbono beta del residuo de ácido aspártico C-terminal.

<u>AP301</u>

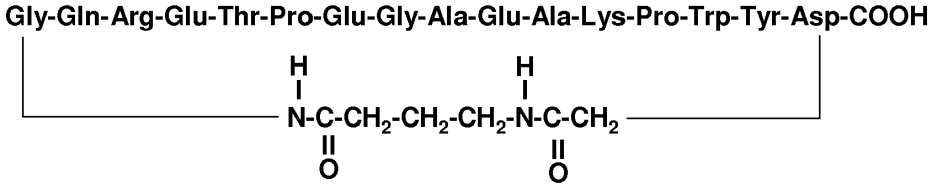
[CGQRETPEGAEAKPWYC] (ciclo Cbeta1-Cbeta17)



Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys

<u>AP318</u>

[Gaba-GQRETPEGAEAKPWYD-OH] (ciclo 1-Dγ17)



Descripción detallada

Se representan detalles adicionales de la invención en las figuras y su descripción.

La figura 1 muestra una comparación de péptidos AP301 y AP318.

La figura 2 muestra el efecto de AP301 sobre αG70Sβγ-hENaC. Relación I/V de células completas de células HEK-293 que expresan de manera transitoria αG70Sβγ-hENaC representadas gráficamente para el control, en presencia de AP301 240 nM y después de la adición de amilorida 10 μM.

La figura 3 muestra el efecto de AP301 sobre αβγG40S-hENaC. Relación I/V de células completas de células HEK-

293 que expresan de manera transitoria αβγG40S-hENaC representadas gráficamente para el control, en presencia de AP301 240 nM y después de la adición de amilorida 10 μM.

La figura 4 muestra el efecto de AP301 sobre δG71Sβγ-hENaC. Relación I/V de células completas de células HEK-293 que expresan de manera transitoria δG71Sβγ-hENaC representadas gráficamente para el control, en presencia de AP301 240 nM y después de la adición de amilorida 10 μM.

La figura 5 muestra el efecto de AP301 sobre αβG37Sγ-hENaC mutante de PHA tipo Ib. Relación I/V de células completas de células HEK-293 que expresan de manera transitoria αβG37Sγ-hENaC representadas gráficamente para el control, en presencia de AP301 240 nM y después de la adición de amilorida 10 μM.

La figura 6 muestra gráficos de barras de corrientes de sodio interiores sensibles a amilorida. Las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con subunidades mutantes indicadas se parchearon en el modo de célula completa; se produjo corriente interior a -100 mV. Se aplicaron 200 nM de AP318 o AP301.

Síntesis de péptidos cíclicos

Todos los péptidos se sintetizan por métodos en fase sólida; se han diseñado para retener la conformación nativa del dominio similar a lectina tanto como sea posible mientras que al mismo tiempo exploran soluciones de enlace alternativas para provocar la ciclación de la secuencia lineal.

Los péptidos se sintetizan mediante síntesis de péptidos en fase sólida según la estrategia de protección de fluorenilmetiloxicarbonilo/t-butilo en resina de cloruro de 2-clorotritilo. La diisopropil carbodiimida y el N-hidroxibenzotriazol se usan como reactivos de acoplamiento Todas las etapas de acoplamiento se llevan a cabo en N-N-dimetilformamida. Los aminoácidos protegidos se acoplan sucesivamente a la cadena peptídica, comenzando con el aminoácido C-terminal. La desprotección de fluorenilmetoxicarbonilo se lleva a cabo en piperidina al 20% en N-N-dimetilformamida. La escisión del péptido parcialmente protegido completo de la resina se lleva a cabo en una mezcla 1:1 de ácido acético y diclorometano. En el caso de solnatida y péptido TIP mutante, después de la escisión de la resina, se lleva a cabo la desprotección de la cadena lateral en el 95% de ácido trifluoroacético al 95%, el 5% de agua, seguido de ciclación por oxidación de residuos de cisteína terminal, lograda por aireación del péptido lineal bruto a pH 8,5 durante 90 horas. El producto peptídico bruto se purifica por cromatografía de líquidos de presión media en fase inversa (RP-MPLC) en una columna de gel de sílice RP-C18 con un gradiente del 5% - 40% de acetonitrilo. Finalmente, el contraión de trifluoroacetato se reemplaza por acetato en una columna Lewatit MP64 (forma de acetato). Después de un lavado final en agua, el péptido purificado como sal de acetato se liofiliza y se obtiene como un polvo blanco a blanquecino. En el caso de péptidos libres de cisteína, la etapa de ciclación se lleva a cabo en el péptido lineal parcialmente protegido después de la escisión de la resina de cloruro de 2-clorotritilo. Después de la ciclación selectiva de los péptidos libres de cisteína, la desprotección de la cadena lateral en ácido trifluoroacético seguido de RP-MPLC preparativa, el reemplazo del ion de trifluoroacetato por acetato y la liofilización de la forma de acetato del péptido se llevó a cabo como para los péptidos que contienen cisteína. En el caso de AP318, en el que la ciclación implica la formación de enlaces amida a través del grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido aspártico, la ciclación selectiva se logra al comenzar la síntesis usando el ácido aspártico C-terminal protegido en N con el grupo fluorenilmetiloxicarbonilo y con el grupo C-alfa carboxilo protegido con un grupo butilo terciario (OtBu). La síntesis continúa mediante la unión del residuo de ácido aspártico C-terminal a la resina de tritilo a través del grupo carboxilo de cadena lateral, seguido de la adición por etapas de los residuos de aminoácidos protegidos a la cadena peptídica. Después de la desprotección del grupo amino del ácido 4-aminobutanoico N-terminal y la escisión del péptido protegido de cadena lateral de la resina, la ciclación se lleva a cabo a través del grupo carboxilo de la cadena lateral libre y el grupo amino del ácido 4-aminobutanoico N-terminal. Finalmente, los grupos protectores de la cadena lateral se retiran con ácido trifluoroacético y el péptido se purifica por RP-MPLC como para los otros péptidos.

Las masas moleculares de los péptidos se confirman por espectrometría de masas por ionización por electropulverización o MALDI-TOF-MS y su pureza se determina por cromatografía de líquidos analítica de alto rendimiento.

Ensayo electrofisiológico de la activación de AP301 y AP318 de ENaC expresado de forma endógena y heteróloga

Las propiedades activadoras de ENaC de los péptidos cíclicos se someten a prueba electrofisiológicamente *in vitro* usando técnicas de pinzamiento zonal de células completas y unicelulares Hazemi *et al*, 2010; Tzotzos *et al*, 2013; Shabbir *et al*, 2013). Se usa un ensayo de pinzamiento zonal de células completas para medir la corriente de Na+ sensible a amilorida inducida, calcular las curvas de concentración-respuesta y, por tanto, estimar la potencia medida como concentración efectiva a la mitad de la respuesta máxima (CE50), para péptidos cíclicos.

Los experimentos de pinzamiento zonal se realizan para estimar la potencia de AP301/AP318 en αβγ-hENaC expresado de manera transitoria en células HEK-293, CHO y células A549

Resumen de la justificación para investigar la posible aplicación de AP301 y AP318 para el tratamiento de los síntomas pulmonares de pacientes que padecen PHA tipo 1b

El pseudohipoaldosteronismo tipo 1B (PHA tipo 1B) está provocado por mutaciones de pérdida de función en los genes que codifican el canal de sodio epitelial sensible a amilorida (ENaC). El estado se presenta en los recién nacidos como deshidratación grave, hiponatremia e hiperpotasemia potencialmente mortales debido a la pérdida de sodio en los riñones, el colon, los pulmones y las glándulas sudoríparas y salivales; los niños padecen dolencias pulmonares porque la absorción de líquido dependiente de sodio reducida da como resultado niveles elevados de líquido pulmonar. La enfermedad no muestra mejoría con la edad y los pacientes requieren suplementos de sal de por vida y manipulación dietética para reducir los niveles de potasio.

AP301 y AP318 pueden aplicarse en un ensayo de pinzamiento zonal para someter a prueba la respuesta de las células que expresan de manera heteróloga en subunidades de ENaC humanas en las que se han introducido mutaciones de pérdida de función que se sabe que provocan PHA tipo 1B por mutagénesis dirigida al sitio. De esta manera, puede medirse la capacidad de AP301 y AP318 para restablecer la corriente de sodio sensible a amilorida en las células que expresan estas subunidades de ENaC con pérdida de función mutadas. El aumento de la corriente de sodio en presencia de péptidos cíclicos indica su capacidad para restablecer el movimiento de iones Na^+ por ENaC con pérdida de función que porta mutaciones de PHA tipo 1B, para restablecer la función de ENaC y su potencial como terapias para pacientes con PHA tipo 1B.

Sorprendentemente, se ha detectado que los péptidos cíclicos tales como AP301 y AP318 pueden restablecer la actividad de transporte de iones Na^+ a ENaC mutante con pérdida de función. Por tanto, AP301 y AP318 son terapias potenciales para los síntomas pulmonares de PHA tipo 1B.

Protocolo experimental

Estudio *in vitro* del efecto de AP301 y AP318 sobre ENaC expresado de manera heteróloga que porta de mutaciones de PHA tipo 1B

El efecto de los péptidos cíclicos sobre la corriente de Na+ sensible a amilorida se observó en células HEK que expresan de manera heteróloga las subunidades de ENaC humanas (las células HEK no muestran expresión endógena de ENaC [Ruffieux-Daidie *et al*, 2008]) en las que mutaciones puntuales individuales de ENaC alfa, beta y gamma, la misma que las encontradas responsables del fenotipo patológico de pacientes que padecen PHA tipo 1B, se introdujo mediante mutagénesis dirigida al sitio. Además, las subunidades de ENaC delta mutantes también se construyeron mediante mutagénesis dirigida al sitio, que contiene mutaciones homólogas a las observadas en posiciones conservadas en las otras tres subunidades de ENaC.

Construcción de mutantes de PHA tipo I de ENaC y expresión en HEK 293

Pueden reproducirse diversos tipos de mutaciones de ENaC mediante mutagénesis dirigida al sitio del ADN de la subunidad de ENaC silvestre clonada en vectores plasmídicos.

Mutagénesis dirigida al sitio

Se introdujeron mutaciones puntuales en ADNc que codifica para ENaC alfa, beta, gamma y delta usando un kit de mutagénesis dirigida al sitio disponible comercialmente (kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange Lightning; Agilent Technologies). Los ADNc que codifican para hENaC alfa, beta y gamma se habían donado por el Dr. Peter Snyder (Universidad de Iowa, Carver College of Medicine, Iowa City, IA); el ADNc que codifica para hENaC delta se había donado por el Dr. Mike Althaus (Universidad Justus-Liebig, Giessen, Alemania).

Los cebadores mutagénicos se diseñaron individualmente basándose en las descripciones de las mutaciones individuales en los informes científicos originales. El programa de diseño de cebadores proporcionado en el sitio web del fabricante se usó como una guía y los cebadores se pidieron de Sigma-Aldrich. Las cadenas mutantes se sintetizaron por PCR con una ADN polimerasa basada en Pfu usando 100 ng de ADNc silvestre (WT) que codifica para hENaC alfa, beta, gamma o delta. Las cadenas parentales (WT) se retiraron y el ADN plasmídico resultante que contenía ENaC mutado se transformó en células competentes de *E. coli*. Después del crecimiento en cultivo, el ADN plasmídico se extrajo de las células de *E. coli* usando un kit de aislamiento de plásmidos disponible comercialmente (GeneJET Plasmid Miniprep Kit; Thermoscientific) y se aisló por cromatografía en columna. Todos los constructos mutantes se verificaron mediante mapeo y secuenciación de sitios de restricción.

Transfección de células HEK-293 para la expresión heteróloga de hENaC

Las células HEK-293 se transfectaron con ADN plasmídico de hENaC alfa, beta, gamma y delta mutante y hENaC alfa, beta, gamma y delta WT usando un kit comercialmente disponible (reactivo de transfección X-treme Gene HP (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemania) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Una subunidad mutante junto con las dos subunidades WT restantes se transfectaron simultáneamente para proporcionar la expresión de ENaC mutante trimérico. La expresión de ENaC WT se logró mediante transfección simultánea con ADN plasmídico de hENaC alfa, beta y gamma WT o con ADN plasmídico de hENaC delta, beta y gamma WT.

Prueba de pinzamiento zonal de la capacidad de activación de ENaC de AP301 y AP318 en células HEK que expresan de manera transitoria ENaC mutante

Cada línea celular HEK-293 que expresa de manera transitoria αβγ-hENaC WT, δβγ-hENaC WT o una subunidad de hENaC mutante coexpresada con subunidades WT, se sometió a prueba en un ensayo de pinzamiento zonal de células completas con AP301 y mutantes seleccionados en posiciones conservadas con AP318. Se registraron corrientes de células completas tal como se describió previamente (Shabbir *et al*, 2013).

Mediciones de respuesta de concentración

Se trazaron curvas de concentración-respuesta, y se determinaron los valores de CE50 y los coeficientes de Hill usando Microcal Origin 7.0. La corriente de sodio de células completas de las células HEK-293 transfectadas de manera transitoria con αβγ-hENaC WT, δβγ-hENaC WT o un hENaC mutante, se registró a un potencial de retención (Eh) de -80 mV después de la adición acumulativa de disolución madre de AP301 a la disolución de baño, dando como resultado concentraciones finales de solnatida que oscilan desde 3,5 hasta 240 nM. Finalmente, se añadió amilorida para permitir la estimación del aumento inducido por péptidos en la corriente de Na+ sensible a amilorida. La actividad de AP301 se expresó como un porcentaje de la respuesta de amilorida emparejada, debido a la variabilidad en la expresión de hENaC entre diferentes lotes de células cultivadas. Se usó amilorida a 10 μM para αβγ-hENaC WT, δβγ-hENaC WT o hENaC mutante; estas concentraciones produjeron una inhibición de hENaC superior al 95%. Sólo las células con respuesta clara de amilorida se incluyeron en el análisis de datos.

Relaciones corriente-voltaje

Se determinaron las relaciones corriente-voltaje (I/V) de células completas de células HEK-293 infectadas de manera transitoria con αβγ-hENaC, δβγ-hENaC WT o un hENaC mutante para el control (antes de la adición de AP301), tratamiento con AP301 240 nM y tras la adición de amilorida 10 μM, respectivamente. Después de la formación del sello GOhm (sello G'Ω) y un periodo de equilibrio de 5 min, se registró corriente de sodio a Eh de desde -80 hasta +80 mV en incrementos de 20 mV mantenidos durante 1 min en cada Eh.

Análisis estadístico

Los datos representan la media ± EE a menos que se indique lo contrario; los experimentos se realizaron en tres a siete lotes de células transfectadas independientemente en el sistema de expresión heterólogo HEK-293. La significación estadística entre los diferentes grupos se determinó usando una prueba de la t de Student de dos colas no apareada usando GraphPad Prism versión 3.02 (GraphPad Software, San Diego).

RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de AP301 en un ensayo de pinzamiento zonal de células completas con células HEK-293 que expresan hENaC mutante de PHA tipo 1B y homólogos

hENaC	Corriente sensible a amilorida (pA)	Corriente de Na+ restaurada de AP301 (pA)	CE_{50} (nM)
αβγ WT	81,2 ± 5,5		54,7 ± 2,2[c]
δβγ WT	93,5 ± 9,5		46,2 ± 1,5
αG70Sβγ	pérdida de función	392,1 ± 14,2	61,9 ± 2,1
αβG37Sγ[a]	pérdida de función	192,8 ± 12,3	65,8 ± 3,2
αβγG40S	pérdida de función	90,8 ± 8,9	69,1 ± 2,7
δG71Sβγ	pérdida de función	185,1 ± 21,2	42,9 ± 0,5
αQ101Kβγ[a]	pérdida de función	79,1 ± 11,2	
αβQ66Kγ	pérdida de función	448,5 ± 57,5	56,9 ± 16,7
αβγQ70K	pérdida de función	305,2 ± 10,1	61,5 ± 4,0
δQ102Kβγ	pérdida de función	121,9 ± 14,6	
αC133Yβγ[a]	pérdida de función	111,8 ± 10,6	
αβC98Yγ	pérdida de función	296,3 ± 4,2	79,4 ± 1,7
αβγC100Y	pérdida de función	307,9 ± 15,7	88,2 ± 11,9
δC134Yβγ	pérdida de función	219,1 ± 19,8	
αG327Cβγ[a]	pérdida de función	196,8 ± 16,7	
αβG294Cγ	pérdida de función	76,9 ± 13,5	
αβγG305C	pérdida de función	125,5 ± 15,7	
δG303Cβγ	pérdida de función	48,5 ± 8,2	

([a] - mutantes observados en pacientes)

Efecto de AP301 sobre αβG37Sγ-hENaC de PHA tipo 1B y homólogos

El efecto de AP301 sobre las células HEK-293 que expresan el αβG37Sγ-hENaC mutante de PHA tipo 1b o uno de sus homólogos construidos en laboratorio se muestra en las siguientes figuras. Se muestran relaciones de corriente-voltaje (I/V) de células completas para cada hENaC con pérdida de función mutante expresado de manera transitoria en células HEK-293, así como valores medios absolutos de densidad de corriente interior a un potencial de retención de -80 mV durante la fase de control, después de la adición de AP301 240 nM y después de la adición final de amilorida (10 μM) a la disolución de baño (las figuras a continuación).

Efecto de AP318 sobre ENaC mutante de PHA tipo 1B

Para someter a prueba si el efecto de restablecimiento de la actividad en el ENaC mutante de PHA tipo 1B es exclusivo de AP301 o si es una propiedad de péptidos cíclicos en general, tres ENaC mutantes de PHA tipo 1B que contienen mutaciones en las subunidades de α-, β- y γ-hENaC, respectivamente, se sometieron a prueba en un ensayo de pinzamiento zonal de células completas en presencia de AP318 así como de AP301. Los tres mutantes se han observado en pacientes que padecen PHA tipo 1B y se producen en posiciones conservadas en las subunidades de ENaC; dos de estos mutantes, αQ101Kβγ-hENaC y αβG37Sγ-hENaC se habían sometido a prueba previamente con AP301. El tercer mutante se produce en la subunidad γ: αβγV543fs-hENaC y, en contraste con todos los mutantes sometidos a prueba hasta ahora, es un mutante de desplazamiento de marco que da como resultado una subunidad γ truncada. Los resultados de la prueba de células HEK-293 que expresan estos ENaC mutantes en un ensayo de pinzamiento zonal de células completas en presencia de AP318 y AP301 se muestran en la tabla 2 y la figura 6.

Tabla 2. Corriente sensible a amilorida en un ensayo de pinzamiento zonal de células completas de células HEK-293 que expresan de manera transitoria ENaC WT y ENaC que contiene mutaciones de PHA tipo 1b en ausencia (control) y presencia de AP301 y AP318 (valores medios ± EE para la corriente interior medida en pA, n = 5; concentración de péptido 220 nM).

ENaC	Sin péptido	AP301	AP318
	Corriente interior (pA)	Corriente interior medida (pA) Concentración de péptidos 220 nM	
αβγ-hENaC WT	67,2±5,2		
αQ101Kβγ-hENaC	pérdida de función	174,7±8,7	176,7±6.9
αβG37Sγ-hENaC	pérdida de función	189,8±7,1	191,8±5,8
αβγV543fs-hENaC	pérdida de función	143,3±8,2	177,7±6,5

Las siguientes conclusiones pueden extraerse de los resultados obtenidos hasta ahora:

1) Las mutaciones de PHA tipo 1B dieron como resultado una pérdida de función en la corriente de sodio sensible a amilorida a través de ENaC en comparación con hENaC WT.

2) AP301 restableció la capacidad de transporte de iones Na^+ y compensó las mutaciones de aminoácidos de todos los hENaC con pérdida de función mutantes observados en pacientes con PHA tipo 1B: αβG37Sγ-hENaC, αQ101Kβγ-hENaC y αG327Cβγ-hENaC.

3) En comparación con el nivel fisiológico de la corriente de iones de sodio sensible a amilorida observada con αβγ-hENaC y δβγ-hENaC WT, AP301 restableció la corriente de iones de sodio sensible a amilorida de ENaC con pérdida de función mutante a niveles comparables con ENaC activo no mutante.

4) Las curvas de concentración-respuesta y los valores de CE50 para αβG37Sγ-hENaC mutante de PHA tipo 1B y los homólogos correspondientes indican que AP301 tiene el potencial de restablecer la actividad y compensar las mutaciones de aminoácidos en todos estos canales de ENaC mutantes, que tienen pérdida de función en comparación con αβγ-hENaC y δβγ-hENaC WT.

5) Las relaciones de corriente-voltaje (I/V) para αβG37Sγ-hENaC mutante de PHA tipo 1B y los homólogos correspondientes caracterizan el efecto restablecedor de AP301 en estos canales mutantes con mayor detalle. La misma mutación que se produce en una posición conservada en las diferentes subunidades de hENaC da como resultado un canal de iones de sodio con diferentes propiedades funcionales y efecto fenotípico, tal como se refleja claramente por la actividad restablecida en presencia de AP301 (tabla 3).

6) Los resultados del ensayo electrofisiológico de células completas en ausencia de AP301 y AP318 muestran que, en comparación con el tipo silvestre, las mutaciones de PHA tipo 1B en todas las subunidades de αβγ-hENaC dan como resultado pérdida de función. En presencia de AP301 y AP318, se observó un aumento significativo de la corriente de iones de sodio sensible a amilorida a través de mutantes de PHA-1B que demuestran el restablecimiento de la función normal del canal de iones de sodio.

Conclusión global

Puede concluirse a partir de estos resultados que AP301 y AP318 pueden restablecer el transporte de iones Na^+ y compensar las mutaciones de aminoácidos en los hENaC mutantes de PHA tipo 1B con pérdida de función, lo que indica el potencial de los péptidos cíclicos para restablecer la función deteriorada de ENaC y compensar las mutaciones de aminoácidos en estos mutantes y, por tanto, actuar como terapia para tratar a los pacientes que padecen PHA sistémico tipo I.

Bibliografía

1. Aberer E, Gebhart W, Mainitz M, Pollak A, Reichel G, Scheibenreiter S. [Sweat glands in pseudohypoaldosteronism]. Hautarzt. Agosto de 1987;38(8):484-7. German. PubMed PMID: 3654220.

2. Adachi M, Tachibana K, Asakura Y, Abe S, Nakae J, Tajima T, Fujieda K. Compound heterozygous mutations in the gamma subunit gene of ENaC (1627delG and 1570-1G->A) in one sporadic Japanese patient with a systemic form of pseudohypoaldosteronism type 1. J Clin Endocrinol Metab. Enero de 2001;86(1):9-12. PubMed PMID: 11231969.

3. Akkurt I, Kuhnle U, Ringenberg C. Pseudohypo-aldosteronism and cholelithiasis: coincidence or pathogenetic correlation? Eur J Pediatr. Mayo de 1997;156(5):363-6. PubMed PMID: 9177977.

4. Althaus M, Clauss WG, Fronius M. Amiloride-sensitive sodium channels and pulmonary edema. Pulm Med. 2011;2011:830320. Epub 29 de diciembre de 2010. PubMed PMID: 21637371.

5. Amin N, Alvi NS, Barth JH, Field HP, Finlay E, Tyerman K, Frazer S, Savill G, Wright NP, Makaya T, Mushtaq T. Pseudohypoaldosteronism type 1: clinical features and management in infancy. Endocrinol Diabetes Metab Case Rep. 2013;2013:130010. doi: 10.1530/EDM-13-0010. Epub 30 de agosto de 2013. PubMed PMID: 24616761; PubMed Central PMCID: PMC3922296.

6. Baconguis I, Bohlen CJ, Goehring A, Julius D, Gouaux E. X-ray structure of acid-sensing ion channel 1 snake toxin complex reveals open state of a Na(+)-selective channel. Cell. 13 de febrero de 2014;156(4):717-29. doi: 10.1016/j.cell.2014.01.011. Epub 6 febrero de 2014. PubMed PMID: 24507937; PubMed Central PMCID: PMC4190031.

7. Belot A, Ranchin B, Fichtner C, Pujo L, Rossier BC, Liutkus A, Morlat C, Nicolino M, Zennaro MC, Cochat P. Pseudohypoaldosteronisms, report on a 10-patient series. Nephrol Dial Transplant. Mayo de 2008;23(5):1636-41. doi: 10.1093/ndt/gfm862. PubMed PMID: 18424465.

8. Bonny O, Chraibi A, Loffing J, Jaeger NF, Gründer S, Horisberger JD, Rossier BC. Functional expression of a pseudohypoaldosteronism type I mutated epithelial Na+ channel lacking the pore-forming region of its alpha subunit. J Clin Invest. Octubre de 1999;104(7):967-74. PubMed PMID: 10510337; PubMed Central PMCID: PMC408554.

9. Bonny O, Knoers N, Monnens L, Rossier BC. A novel mutation of the epithelial Na+ channel causes type 1 pseudohypoaldosteronism. Pediatr Nephrol. Octubre de 2002;17(10):804-8. Epub 21 de agosto de 2002. PubMed PMID: 12376807.

10. Bonny O, Rossier BC. Disturbances of Na/K balance: pseudohypoaldosteronism revisited. J Am Soc Nephrol. Septiembre de 2002;13(9):2399-414. Revisión. PubMed PMID: 12191985.

11. Braun C, Hamacher J, Morel DR, Wendel A, Lucas R. Dichotomal role of TNF in experimental pulmonary edema reabsorption. J Immunol. 1 de septiembre de 2005;175(5):3402-8. PubMed PMID: 16116234.

12. Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC. (B) Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits. Nature. 3 de febrero de 1994;367(6462):463-7. PubMed PMID: 8107805.

13. Chang SS, Grunder S, Hanukoglu A, Rösler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-

Williams C, Rossier BC, Lifton RP. Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. Nat Genet. Marzo de 1996;12(3):248-53. PubMed PMID: 8589714.

14. Cheek DB, Perry JW. A salt wasting syndrome in infancy. Arch Dis Child. Junio de 1958;33(169):252-6. PubMed PMID: 13545877; PubMed Central PMCID: PMC2012226.

15. Czikora I, Alli A, Bao HF, Kaftan D, Sridhar S, Apell HJ, Gorshkov B, White R, A, Wendel A, Pauly-Evers M, Hamacher J, Garcia-Gabay I, Fischer B, Verin A, Bagi Z, Pittet JF, Shabbir W, Lemmens-Gruber R, Chakraborty T, Lazrak A, Matthay MA, Eaton DC, Lucas R. A Novel TNF-mediated Mechanism of Direct Epithelial Sodium Channel Activation. Am J Respir Crit Care Med. 16 de julio de 2014. PubMed PMID: 25029038.

16. Dirlewanger M, Huser D, Zennaro MC, Girardin E, Schild L, Schwitzgebel VM. A homozygous missense mutation in SCNN1A is responsible for a transient neonatal form of pseudohypoaldosteronism type 1. Am J Physiol Endocrinol Metab. Septiembre de 2011;301(3):E467-73. doi: 10.1152/ajpendo.00066.2011. Epub 7 de junio de 2011. PubMed PMID: 21653223.

17. Dogan CS, Erdem D, Mesut P, Merve A, Sema A, Iffet B, Afig B. A novel splice site mutation of the beta subunit gene of epithelial sodium channel (ENaC) in one Turkish patient with a systemic form of pseudohypoaldosteronism Type 1. J Pediatr Endocrinol Metab. 2012;25(9-10):1035-9. doi: 10.1515/jpem-2012-0083. PubMed PMID: 23426840.

18. Dulebo A, Ettrich R, Lucas R, Kaftan D. A computational study of the oligosaccharide binding sites in the lectin-like domain of Tumor Necrosis Factor and the TNF-derived TIP peptide. Curr Pharm Des. 2012;18(27):4236-43. PubMed PMID: 22697478; PubMed Central PMCID: PMC3495565.

19. Eaton DC, Helms MN, Koval M, Bao HF, Jain L. The contribution of epithelial sodium channels to alveolar function in health and disease. Annu Rev Physiol.2009;71:403-23. doi: 10.1146/annurev.physiol.010908.163250. Revisión. PubMed PMID: 18831683.

20. Edelheit O, Hanukoglu I, Gizewska M, Kandemir N, Tenenbaum-Rakover Y, Yurdakök M, Zajaczek S, Hanukoglu A. Novel mutations in epithelial sodium channel (ENaC) subunit genes and phenotypic expression of multisystem pseudohypoaldosteronism. Clin Endocrinol (Oxf). Mayo de 2005;62(5):547-53. Revisión. PubMed PMID: 15853823.

21. Edelheit O, Hanukoglu I, Shriki Y, Tfilin M, Dascal N, Gillis D, Hanukoglu A.Truncated beta epithelial sodium channel (ENaC) subunits responsible for multi-system pseudohypoaldosteronism support partial activity of ENaC. J Steroid Biochem Mol Biol. Marzo de 2010;119(1-2):84-8. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.01.002. Epub 12 de enero de 2010. PubMed PMID: 20064610.

22. Ekinci Z, Aytac MB, Cheong HI. A case of SCNN1A splicing mutation presenting as mild systemic pseudohypoaldosteronism type 1. J Pediatr Endocrinol Metab. 2013;26(11-12):1197-200. doi: 10.1515/jpem-2013-0053. PubMed PMID: 23813355.

23. Elia N, Tapponnier M, Matthay MA, Hamacher J, Pache JC, Brundler MA, Totsch M, De Baetselier P, Fransen L, Fukuda N, Morel DR, Lucas R. Functional identification of the alveolar edema reabsorption activity of murine tumor necrosis factor-alpha. Am J Respir Crit Care Med. 1 de noviembre de 2003;168(9):1043-50. Epub 3 de julio de 2003. PubMed PMID: 12842853.

24. Fukuda N, Jayr C, Lazrak A, Wang Y, Lucas R, Matalon S, Matthay MA. Mechanisms of TNF-alpha stimulation of amiloride-sensitive sodium transport across alveolar epithelium. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. Junio de 2001;280(6):L1258-65. PubMed PMID: 11350806.

25. Garty H, Palmer LG. Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. Physiol Rev. Abril de 1997;77(2):359-96. Revisión. PubMed PMID: 9114818.

26. Geller DS, Rodriguez-Soriano J, Vallo Boado A, Schifter S, Bayer M, Chang SS, Lifton RP. Mutations in the mineralocorticoid receptor gene cause autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type I. Nat Genet. Julio de 1998;19(3):279-81. PubMed PMID: 9662404.

27. Gonzales EB, Kawate T, Gouaux E. Pore architecture and ion sites in acid-sensing ion channels and P2X receptors. Nature. 30 de julio de 2009;460(7255):599-604. doi: 10.1038/nature08218. PubMed PMID: 19641589; PubMed Central PMCID: PMC2845979.

28. Gründer S, Firsov D, Chang SS, Jaeger NF, Gautschi I, Schild L, Lifton RP, Rossier BC. A mutation causing pseudohypoaldosteronism type 1 identifies a conserved glycine that is involved in the gating of the epithelial sodium channel. EMBO J. 3 de marzo de 1997;16(5):899-907. PubMed PMID: 9118951; PubMed Central PMCID: PMC1169690.

29. Güran T, Değirmenci S, Bulut iK, Say A, Riepe FG, Güran Ö. Critical points in the management of pseudohypoaldosteronism type 1. J Clin Res Pediatr Endocrinol. 2011;3(2):98-100. doi: 10.4274/jcrpe.v3i2.20. Epub

8 de junio de 2011. PubMed PMID: 21750640; PubMed Central PMCID: PMC3119449.

30. Hamacher J, Stammberger U, Roux J, Kumar S, Yang G, Xiong C, Schmid RA, Fakin RM, Chakraborty T, Hossain HM, Pittet JF, Wendel A, Black SM, Lucas R. The lectin-like domain of tumor necrosis factor improves lung function after rat lung transplantation--potential role for a reduction in reactive oxygen species generation. Crit Care Med. Marzo de 2010;38(3):871-8. PubMed PMID: 20081530.

31. Hanukoglu A, Bistritzer T, Rakover Y, Mandelberg A. Pseudohypoaldosteronism with increased sweat and saliva electrolyte values and frequent lower respiratory tract infections mimicking cystic fibrosis. J Pediatr. Noviembre de 1994;125(5 Pt 1):752-5. PubMed PMID: 7965429.

32. Hanukoglu A, Edelheit O, Shriki Y, Gizewska M, Dascal N, Hanukoglu I. Renin-aldosterone response, urinary Na/K ratio and growth in pseudohypoaldosteronism patients with mutations in epithelial sodium channel (ENaC) subunit genes. J Steroid Biochem Mol Biol. Septiembre de 2008;111(3-5):268-74. doi: 10.1016/j.jsbmb.2008.06.013. Epub 26 de junio de 2008. PubMed PMID: 18634878.

33. Hartmann EK, Boehme S, Duenges B, Bentley A, Klein KU, Kwiecien R, Shi C, Szczyrba M, David M, Markstaller K. An inhaled tumor necrosis factor-alpha-derived TIP peptide improves the pulmonary function in experimental lung injury. Acta Anaesthesiol Scand. Marzo de 2013;57(3):334-41. doi: 10.1111/aas.12034. Epub 6 de diciembre de 2012. PubMed PMID: 23216436.

34. Hartmann EK, Thomas R, Liu T, Stefaniak J, Ziebart A, Duenges B, Eckle D,Markstaller K, David M. TIP peptide inhalation in experimental acute lung injury: effect of repetitive dosage and different synthetic variants. BMC Anesthesiol. 26 de mayo de 2014;14:42. doi: 10.1186/1471-2253-14-42. eCollection 2014. PubMed PMID: 24904234; PubMed Central PMCID: PMC4046002.

35. Hazemi P, Tzotzos SJ, Fischer B, Andavan GS, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Lemmens-Gruber R. Essential structural features of TNF-α lectin-like domain derived peptides for activation of amiloride-sensitive sodium current in A549 cells. J Med Chem. 25 de noviembre de 2010;53(22):8021-9. doi: 10.1021/jm100767p. Epub 27 de octubre de 2010. PubMed PMID: 20979368; PubMed Central PMCID: PMC2996585.

36. Hribar M, Bloc A, van der Goot FG, Fransen L, De Baetselier P, Grau GE, Bluethmann H, Matthay MA, Dunant Y, Pugin J, Lucas R. The lectin-like domain of tumor necrosis factor-alpha increases membrane conductance in microvascular endothelial cells and peritoneal macrophages. Eur J Immunol. Octubre de 1999;29(10):3105-11. PubMed PMID: 10540321.

37. Huber R, Krueger B, Diakov A, Korbmacher J, Haerteis S, Einsiedel J, Gmeiner P, Azad AK, Cuppens H, Cassiman JJ, Korbmacher C, Rauh R. Functional characterization of a partial loss of-function mutation of the epithelial sodium channel (ENaC) associated with atypical cystic fibrosis. Cell Physiol Biochem. 2010;25(1): 145-58. doi: 10.1159/000272059. Epub 22 de diciembre de 2009. PubMed PMID: 20054153.

38. Hummler E, Barker P, Gatzy J, Beermann F, Verdumo C, Schmidt A, Boucher R, Rossier BC. Early death due to defective neonatal lung liquid clearance in alpha-ENaC-deficient mice. Nat Genet. Marzo de 1996;12(3):325-8. PubMed PMID: 8589728.

39. Huppmann S, Lankes E, Schnabel D, Bührer C. Unimpaired postnatal respiratory adaptation in a preterm human infant with a homozygous ENaC-α unit loss-of-function mutation. J Perinatol. Diciembre de 2011;31(12):802-3. doi: 10.1038/jp.2011.46. PubMed PMID: 22124517.

40. Jain L, Chen XJ, Ramosevac S, Brown LA, Eaton DC. (2001) Expression of highly selective sodium channels in alveolar type II cells is determined by culture conditions. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 280:L646-58.

41. Jasti J, Furukawa H, Gonzales EB, Gouaux E. Structure of acid-sensing ion channel 1 at 1.9 A resolution and low pH. Nature. 20 de septiembre de 2007;449(7160):316-23. PubMed PMID: 17882215.

42. Kala Ahluwalia G, Dasouki M, Lennon A. Phenotypic variation of autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type I: a case in point. Clin Case Rep. Diciembre de 2014;2(6):326-30. doi: 10.1002/ccr3.129. Epub 15 de septiembre de 2014. PubMed PMID: 25548639; PubMed Central PMCID: PMC4270719.

43. Kashlan OB, Adelman JL, Okumura S, Blobner BM, Zuzek Z, Hughey RP, Kleyman TR, Grabe M. Constraint-based, homology model of the extracellular domain of the epithelial Na+ channel α subunit reveals a mechanism of channel activation by proteases. J Biol Chem. 7 de enero de 2011;286(1):649-60. doi: 10.1074/jbc.M110.167098. Epub 25 de octubre de 2010. PubMed PMID: 20974852; PubMed Central PMCID: PMC3013024.

44. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. Physiol Rev. Julio de 2002;82(3):735-67. Revisión. PubMed PMID: 12087134.

45. Kerem E, Bistritzer T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR. Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in

pseudohypoaldosteronism. N Engl J Med. 15 de julio de 1999;341(3):156-62. PubMed PMID: 10403853.

46. Kosari F, Sheng S, Li J, Mak DO, Foskett JK, Kleyman TR. Subunit stoichiometry of the epithelial sodium channel. J Biol Chem. 29 de mayo de 1998;273(22):13469-74. PubMed PMID: 9593680.

47. Krueger B, Schlötzer-Schrehardt U, Haerteis S, Zenkel M, Chankiewitz VE, Amann KU, Kruse FE, Korbmacher C. Four subunits ($\alpha\beta\gamma\delta$) of the epithelial sodium channel (ENaC) are expressed in the human eye in various locations. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2 de febrero de 2012;53(2):596-604. doi: 10.1167/iovs. 11-8581. PubMed PMID: 22167092.

48. Lazrak A, Samanta A, Venetsanou K, Barbry P, Matalon S. Modification of biophysical properties of lung epithelial Na(+) channels by dexamethasone. Am J Physiol Cell Physiol. Septiembre de 2000;279(3):C762-70. PubMed PMID: 10942727.

49. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. Cell. 23 de febrero de 2001;104(4):545-56. Revisión. PubMed PMID: 11239411.

50. Lingueglia E, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M, Barbry P. Expression cloning of an epithelial amiloride-sensitive Na+ channel. A new channel type with homologies to Caenorhabditis elegans degenerins. FEBS Lett. 22 de febrero de 1993;318(1):95-9. PubMed PMID: 8382172.

51. Lucas R, Magez S, De Leys R, Fransen L, Scheerlinck JP, Rampelberg M, Sablon E, De Baetselier P. Mapping the lectin-like activity of tumor necrosis factor. Science. 11 de febrero de 1994;263(5148):814-7. PubMed PMID: 8303299.

52. Lucas R, Yang G, Gorshkov BA, Zemskov EA, Sridhar S, Umapathy NS, Jezierska-Drutel A, Alieva IB, Leustik M, Hossain H, Fischer B, Catravas JD, Verin AD, Pittet JF, Caldwell RB, Mitchell TJ, Cederbaum SD, Fulton DJ, Matthay MA, Caldwell RW, Romero MJ, Chakraborty T. Protein kinase C-α and arginase I mediate pneumolysin-induced pulmonary endothelial hyperpermeability. Am J Respir Cell Mol Biol. Octubre de 2012;47(4):445-53. doi: 10.1165/rcmb.2011-0332OC. Epub 10 de mayo de 2012. PubMed PMID: 22582175; PubMed Central PMCID: PMC3488628.

53. Marquardt A, Bernevic B, Przybylski M. Identification, affinity characterisation and biological interactions of lectin-like peptide-carbohydrate complexes derived from human TNF-alpha using high-resolution mass spectrometry. J Pept Sci. Diciembre de 2007;13(12):803-10. PubMed PMID: 17918767.

54. Marthinsen L, Kornfält R, Aili M, Andersson D, Westgren U, Schaedel C. Recurrent Pseudomonas bronchopneumonia and other symptoms as in cystic fibrosis in a child with type I pseudohypoaldosteronism. Acta Paediatr. Abril de 1998;87(4):472-4. PubMed PMID: 9628311.

55. McDonald FJ, Yang B, Hrstka RF, Drummond HA, Tarr DE, McCray PB Jr, Stokes JB, Welsh MJ, Williamson RA. Disruption of the beta subunit of the epithelial Na+ channel in mice: hyperkalaemia and neonatal death associated with a pseudohypoaldosteronism phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A. 16 de febrero de 1999;96(4):1727-31. PubMed PMID: 9990092; PubMed Central PMCID: PMC15575.

56. Mora-Lopez F, Bernal-Quiros M, Lechuga-Sancho AM, Lechuga-Campoy JL, Hernandez-Trujillo N, Nieto A. Novel mutation in the epithelial sodium channel causing type I pseudohypoaldosteronism in a patient misdiagnosed with cystic fibrosis. Eur J Pediatr. Junio de 2012;171(6):997-1000. doi: 10.1007/s00431-012-1697-5. Epub 28 de febrero de 2012. PubMed PMID: 22371258.

57. Riepe FG, van Bemmelen MX, Cachat F, Plendl H, Gautschi I, Krone N, Holterhus PM, Theintz G, Schild L. Revealing a subclinical salt-losing phenotype in carriers of the novel S562P mutation in the alpha subunit of the epithelial sodium channel. Clin Endocrinol (Oxf). Febrero de 2009;70(2):252-8. doi: 10.1111/j.1365-2265.2008.03314.x. PubMed PMID: 18547339.

58. Riepe FG. Clinical and molecular features of type 1 pseudohypoaldosteronism. Horm Res. 2009;72(1):1-9. doi: 10.1159/000224334. Epub 30 junio de 2009. Revisión. PubMed PMID: 19571553.

59. Rossier BC, Canessa CM, Schild L, Horisberger JD. Epithelial sodium channels. Curr Opin Nephrol Hypertens. Septiembre de 1994;3(5):487-96. Revisión. PubMed PMID: 7804746.

60. Ruffieux-Daidié D, Poirot O, Boulkroun S, Verrey F, Kellenberger S, Staub O. Deubiquitylation regulates activation and proteolytic cleavage of ENaC. J Am Soc Nephrol. Noviembre de 2008;19(11):2170-80. doi: 10.1681/ASN.2007101130. Epub 13 de agosto de 2008. PubMed PMID: 18701608; PubMed Central PMCID: PMC2573013.

61. Saravanapandian N, Paul S, Matthai J. Pseudohypoaldosteronism type 1: a rare cause of severe dyselectrolytemia and cardiovascular collapse in neonates. J Clin Neonatol. Octubre de 2012;1(4):224-6. doi: 10.4103/2249-4847.106007. PubMed PMID: 24027733; PubMed Central PMCID: PMC3762049.

62. Saxena A, Hanukoglu I, Saxena D, Thompson RJ, Gardiner RM, Hanukoglu A. Novel mutations responsible for autosomal recessive multisystem pseudohypoaldosteronism and sequence variants in epithelial sodium channel alpha-, beta-, and gamma-subunit genes. J Clin Endocrinol Metab. Julio de 2002;87(7):3344-50. PubMed PMID: 12107247.

63. Schaedel C, Marthinsen L, Kristoffersson AC, Kornfält R, Nilsson KO, Orlenius B, Holmberg L. Lung symptoms in pseudohypoaldosteronism type 1 are associated with deficiency of the alpha-subunit of the epithelial sodium channel. J Pediatr. Diciembre de 1999;135(6):739-45. PubMed PMID: 10586178.

64. Shabbir W, Scherbaum-Hazemi P, Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Lemmens Gruber R. Mechanism of action of novel lung edema therapeutic AP301 by activation of the epithelial sodium channel. Mol Pharmacol. Diciembre de 2013;84(6):899-910. doi: 10.1124/mol. 113.089409. Epub 27 de septiembre de 2013. PubMed PMID: 24077967; PubMed Central PMCID: PMC3834145.

65. Sharma R, Pandey M, Kanwal SK, Zennaro MC. Pseudohypoaldosteronism type 1: management issues. Indian Pediatr. Marzo de 2013;50(3):331-3. PubMed PMID: 23680607.

66. Silva N, Costa M, Silva A, Sá C, Martins S, Antunes A, Marques O, Castedo S, Pereira A. A case of systemic pseudohypoaldosteronism with a novel mutation in the SCNN1A gene. Endocrinol Nutr. Enero de 2013;60(1):33-6. doi: 10.1016/j.endonu.2012.07.002. Epub 30 de septiembre de 2012. PubMed PMID: 23031435.

67. Staruschenko A. Regulation of transport in the connecting tubule and cortical collecting duct. Compr Physiol. Abril de 2012;2(2):1541-84. Revisión. PubMed PMID: 23227301; PubMed Central PMCID: PMC3516049.

68. Stockand JD, Staruschenko A, Pochynyuk O, Booth RE, Silverthorn DU. Insight toward epithelial Na+ channel mechanism revealed by the acid-sensing ion channel 1 structure. IUBMB Life. Septiembre de 2008 Sep;60(9):620-8. doi: 10.1002/iub.89. Revisión. PMID: 18459164.

69. Strautnieks SS, Thompson RJ, Gardiner RM, Chung E. A novel splice-site mutation in the gamma subunit of the epithelial sodium channel gene in three pseudohypoaldosteronism type 1 families. Nat Genet. Junio de 1996;13(2):248-50. PubMed PMID: 8640238.

70. Strautnieks SS, Thompson RJ, Hanukoglu A, Dillon MJ, Hanukoglu I, Kuhnle U, Seckl J, Gardiner RM, Chung E. Localisation of pseudohypoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping. Hum Mol Genet. Febrero de 1996;5(2):293-9. PubMed PMID: 8824886.

71. Thomas CP, Zhou J, Liu KZ, Mick VE, MacLaughlin E, Knowles M. Systemic pseudohypoaldosteronism from deletion of the promoter region of the human Beta epithelial na(+) channel subunit. Am J Respir Cell Mol Biol. Septiembre de 2002;27(3):314-9. PubMed PMID: 12204893.

72. Tzotzos S, Fischer B, Fischer H, Pietschmann H, Lucas R, Dupré G, Lemmens-Gruber R, Hazemi P, Prymaka V, Shabbir W. AP301, a synthetic peptide mimicking the lectin-like domain of TNF, enhances amiloride-sensitive Na(+) current in primary dog, pig and rat alveolar type II cells. Pulm Pharmacol Ther. Junio de 2013;26(3):356-63. doi:10.1016/j.pupt.2012.12.011. Epub 9 de enero de 2013. PubMed PMID: 23313096; PubMed Central PMCID: PMC3646188.

73. Vadász I, Schermuly RT, Ghofrani HA, Rummel S, Wehner S, Mühldorfer I, Schäfer KP, Seeger W, Morty RE, Grimminger F, Weissmann N. The lectin-like domain of tumor necrosis factor alpha improves alveolar fluid balance in injured isolated rabbit lungs. Crit Care Med. Mayo de 2008;36(5):1543 50. PubMed PMID: 18434905.

74. Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Voilley N, Lazdunski M. Molecular cloning and functional expression of a novel amiloride-sensitive Na+ channel. J Biol Chem. 17 de noviembre de 1995;270(46):27411-4. PubMed PMID: 7499195.

75. Wang J, Yu T, Yin L, Li J, Yu L, Shen Y, Yu Y, Shen Y, Fu Q. Novel mutations in the SCNN1A gene causing Pseudohypoaldosteronism type 1. PLoS One. 6 de junio de 2013;8(6):e65676. doi: 10.1371/journal.pone.0065676. Print 2013. PubMed PMID: 23762408; PubMed Central PMCID: PMC3675083.

76. Welzel M, Akin L, Büscher A, Güran T, Hauffa BP, Högler W, Leonards J, Karges B, Kentrup H, Kirel B, Senses EE, Tekin N, Holterhus PM, Riepe FG. Five novel mutations in the SCNN1A gene causing autosomal recessive pseudohypoaldosteronism type 1. Eur J Endocrinol. 15 de abril de 2013;168(5):707-15. doi: 10.1530/EJE-12-1000. Print 2013 May. PubMed PMID: 23416952.

77. Wong GP, Levine D. Congenital pseudohypoaldosteronism presenting in utero with acute polyhydramnios. J Matern Fetal Med. Marzo-abril de 1998;7(2):76-8. PubMed PMID: 9584819.

78. Zennaro MC, Lombès M. Mineralocorticoid resistance. Trends Endocrinol Metab. Agosto de 2004;15(6):264-70. Revisión. PubMed PMID: 15358279.

Lista de secuencias

<110> APEPTICO Forschung und Entwicklung GmbH

<120> Polipéptido cíclico para el tratamiento de PHA tipo 1B

<130> TY10471

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO:1

<400> 1

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

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SED ID NO:2

<400> 2

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

Cys
```

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cierre de anillo entre la Cys C-terminal y Cys N-terminal mediante enlace disulfuro

<400> 3

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

Cys
```

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cierre de anillo entre Asp C-term. y Gly N-term. mediante enlace amida entre el grp. amino de Gly N-term. y el grupo carboxilo c1 de ácido gamma-aminobutírico y entre el grp. amino del ácido gamma-aminobutírico y C del grp. carboxilo del

<400> 4

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

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SEQ ID NO:5

<400> 5

```
Thr Pro Glu Gly Ala Glu
1               5
```

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido cíclico que comprende al menos seis aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1

Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr

para su uso en el tratamiento de pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1B (PHA tipo 1B).

2. Polipéptido cíclico para su uso según la reivindicación 1, caracterizado porque el polipéptido cíclico comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:5

Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu

de SEQ ID NO:1.

3. Polipéptido cíclico para su uso según la reivindicación 1, caracterizado por al menos siete aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1.

4. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:1

Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr.

5. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el anillo cíclico incluye un enlace disulfuro entre dos aminoácidos cisteína.

6. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque el polipéptido comprende SEQ ID NO:2

Cys-Gly-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Pro-Trp-Tyr-Cys.

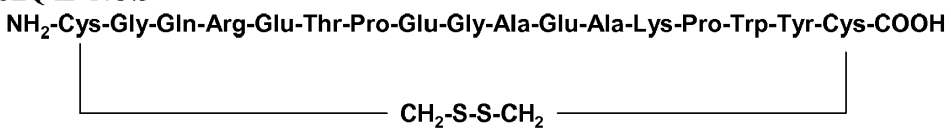
7. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el anillo cíclico incluye un aminoácido no natural.

8. Polipéptido cíclico para su uso según la reivindicación 7, caracterizado porque el aminoácido no natural es ácido γ-aminobutírico (GABA).

9. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 8, caracterizado porque el anillo cíclico comprende al menos 10, preferiblemente al menos 14 aminoácidos de SEQ ID NO:1.

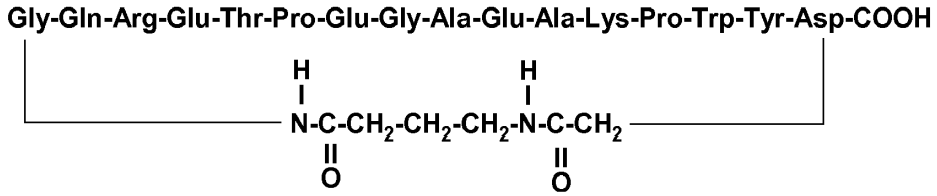
10. Polipéptido cíclico para su uso según una de las reivindicaciones 1 a 9, caracterizado porque es

SEQ ID NO:3



o

SEQ ID NO:4



11. Composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de pseudohipoaldosteronismo autosómico recesivo tipo 1B (PHA tipo 1B) que comprende al menos un polipéptido cíclico según una de las reivindicaciones 1 a 10.

12. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, caracterizada por al menos una molécula de portador farmacéutico.

Fig. 1

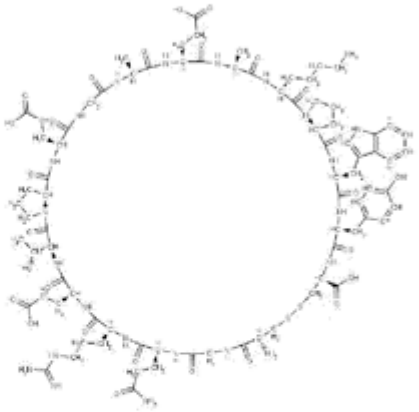
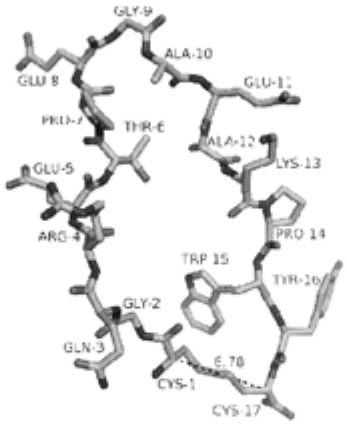
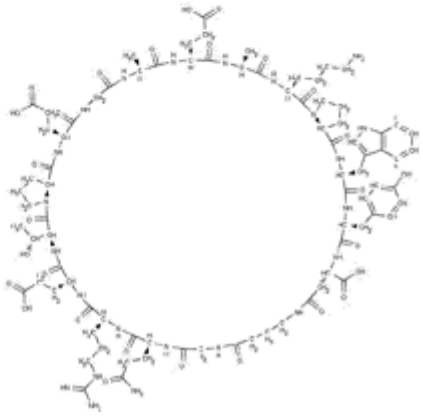
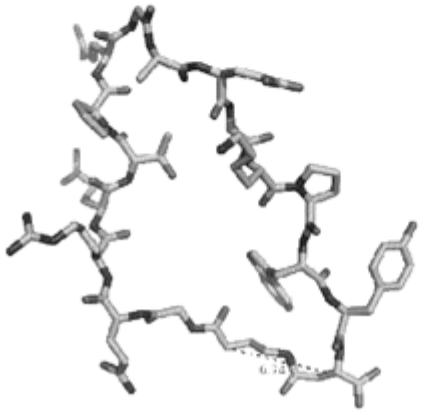
Péptido cíclico	Estructura bidimensional	Modelo estructural tridimensional
AP301		
AP318		

Fig. 2

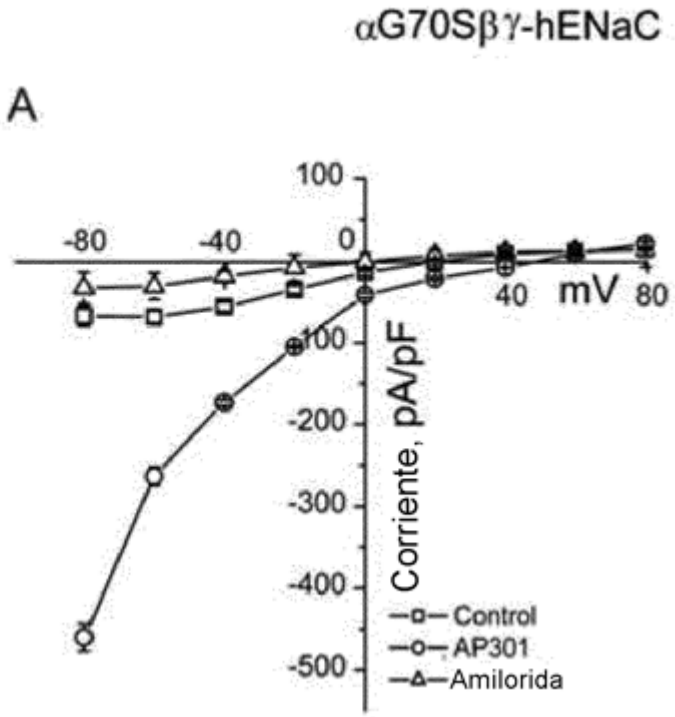

αG70Sβγ-hENaC
A
100
0
-80
-40
40
mV
80
-100
-200
-300
-400
-500
Corriente, pA/pF
Control
AP301
Amilorida

Fig. 3

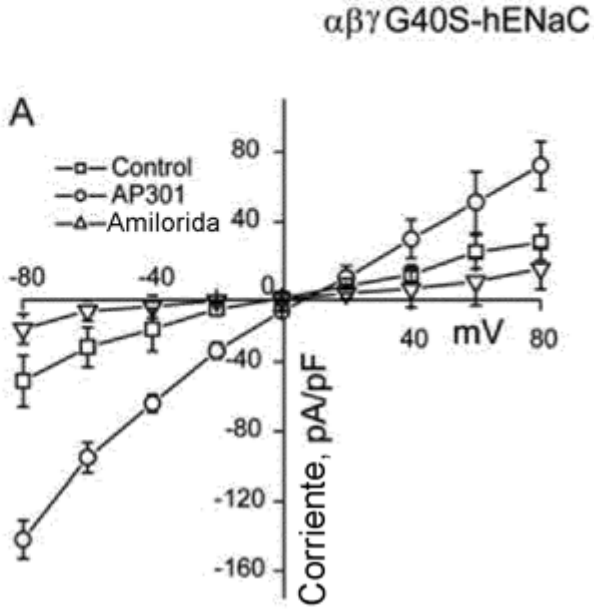

αβγG40S-hENaC
A
Control
AP301
Amilorida
80
40
-80
-40
0
40
mV
80
-40
-80
-120
-160
Corriente, pA/pF

Fig. 4

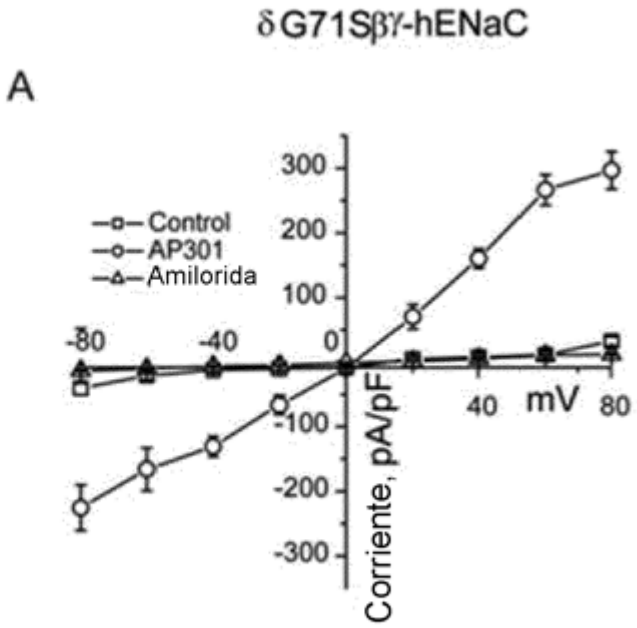

δG71Sβγ-hENaC
A
Control
AP301
Amilorida
300
200
100
0
-100
-200
-300
-80
-40
40
mV
80
Corriente, pA/pF

Fig. 5

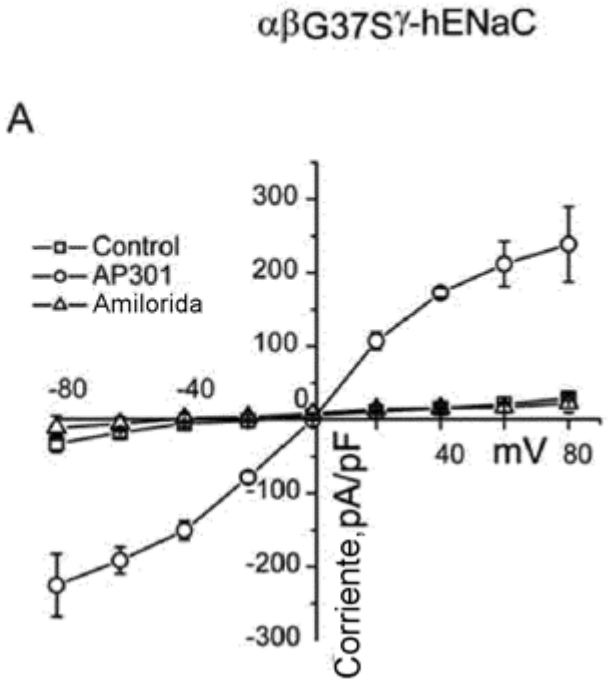
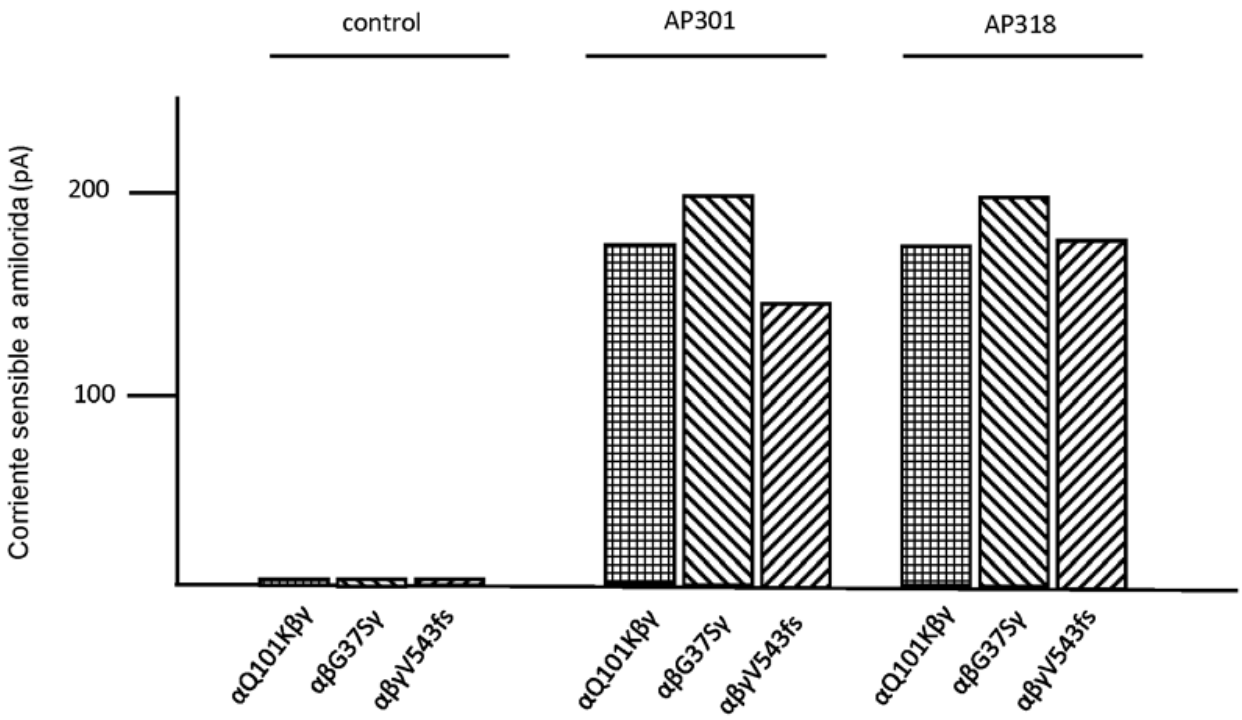

αβG37Sγ-hENaC
A
Control
AP301
Amilorida
300
200
100
0
-100
-200
-300
-80
-40
40
mV
80
Corriente,pA/pF

Fig. 6


control
AP301
AP318
Corriente sensible a amilorida (pA)
200
100
αQ101Kβγ
αβG37Sγ
αβγV543fs
αQ101Kβγ
αβG37Sγ
αβγV543fs
αQ101Kβγ
αβG37Sγ
αβγV543fs