(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 138 561**

(21) Número de solicitud: 009800814

(51) Int. Cl.[6]: A61K 38/22

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **17.04.1998**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **01.01.2000**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **01.01.2000**

(71) Solicitante/s:
Universidad Complutense de Madrid
Rectorado Avenida de Séneca, 2
28040 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Pérez Gomariz, Rosa;**
Leceta Martínez, Javier;
Delgado Mora, Mario y
Martínez Mora, Carmen

(74) Agente: **No consta**

(54) Título: **Uno de los péptidos VIP y PACAP en el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos.**

(57) Resumen:
Uso de los péptidos VIP y PACAP en el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos.
Uso de los péptidos VIP (Péptido intestinal vasoactivo) y PACAP (Péptido inhibidor de la adenilato ciclasa hipofisiaria) en la preparación de fármacos para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos. Estos preparados inhiben la producción del factor de necrosis tumoral e interleuquina 6.

ES 2 138 561 A1

DESCRIPCION

Uso de los péptidos VIP y PACAP en el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos.

Estado de la técnica

El shock endotóxico es todavía la mayor causa de mortalidad hospitalaria. Las estrategias para combatir los efectos del shock endotóxico se centran en contrarrestar los agentes bacterianos responsables del cuadro, en restaurar los parámetros hemodinámicos, prevenir la activación celular y modificar la acción de los mecanismos de defensa (Boyd O; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:98)

Hoy en día se acepta que la respuesta inflamatoria frente a los productos bacterianos contribuye directamente al desarrollo del shock endotóxico (Parillo JE; New England Journal of Medicine 1993, 328: 1471). Los productos tóxicos bacterianos y los liberados durante el daño tisular activan los mecanismos de defensa, implicando a células como neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales, y a mediadores como citoquinas, factor de activación de las plaquetas, metabolitos del ácido araquidónico y óxido nítrico, causando cambios hemodinámicos y orgánicos lesivos para el huésped (Moldawer LL; Critical Care Medicine 1994,22: 3). Muchas citoquinas han sido propuestas como marcadores de la gravedad en el desarrollo del choque séptico. Los niveles circulantes de TNF-, IL-1, IL-6 e IL-8 se han correlacionado con la probabilidad de superar un episodio séptico. TNF-, e IL-1 administradas a humanos o a animales experimentales reproducen muchas de las manifestaciones hemodinámicas del choque séptico (Tracey KJ y col.; 1986, Science 234:470) y se ha ensayado su inhibición mediante inyección de receptores antagonistas y anticuerpos monoclonales bloqueantes con resultados diversos (Fisher CJ y col.; 1994, Critical Care Medicine, 22: 12). Entre los marcadores inmunológicos los niveles circulantes de IL-6 son los mejores indicadores de la gravedad de la sepsis y de las posibilidades de superación del episodio (Liaw YS y col.; 1997, Joumal of the Formosan Medical Association, 96:685).

A pesar del avance en el conocimiento de los mecanismos y de los progresos técnicos y farmacológicos hay todavía pocos resultados en una mejora de los datos de mortalidad que se traducen en una cifra de unos 200.000 decesos al año en Estados Unidos y Europa (Vicent J-L y Chamlou R; Current Opinion in Anaesthesiology 1996, 9:146).

El Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) es un péptido básico de 28 aminoácidos cuya secuencia es (Mutt V y Said SI; European Biochemistry 1974, 42:581):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-
Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-
Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH_2

Se aisló en primer lugar a partir de intestino delgado porcino y posteriormente se identificó en el cerebro y en terminaciones nerviosas del sistema periférico, estableciéndose su naturaleza como neuropéptido con propiedades neuromoduladoras (Fahrenkrug J; Pharmacology and Toxicology 1993, 72:354). Su nombre se debe a sus propiedades vasodilatadoras periféricas. También se ha identificado VIP en células cebadas de rata y en granulomas (Cutz E. Y col.; Nature 1978,275:661). Estudios inmunoquímicos realizados en secciones histológicas de timo, bazo y ganglios linfáticos de rata han identificado VIP inmunoreactivo, en linfocitos de estos órganos (Leceta y col. Advances in Neuroimmunology 1996,629).

El VIP ejerce sus efectos biológicos a través de receptores de membrana pertenecientes a la superfamilia de siete dominios hidrofóbicos acoplados a proteínas G, las cuales transducen la información hasta las moléculas efectoras finales (Laburthe M y Couvineau A; Annals of the New York Academy od Sciences 1988, 527:296). Los receptores para VIP han sido caracterizados en numerosos tejidos como hígado y tejido adiposo entre otros y que corresponden a dos tipos, los llamados VIP1-R (Ishihara T y col.; Neuron 1992, 8:811) y VIP2-R (Lutz E. y col. FEBS Letters 1993, 334:3). En el sistema inmune se han caracterizado receptores específicos para VIP en una variedad de células inmunes que incluyen linfocitos periféricos humanos, monocitos humanos, linfocitos de rata y de ratón, macrófagos alveolares de rata y macrófagos peritoneales de rata y ratón (Delgado M y col.; Regulatory Peptides 1996, 62:161). El VIP modula una gran variedad de funciones inmunes como son la función fagocítica, en cada una de las etapas del proceso, la respuesta proliferativa, la producción de inmunoglobulinas, la actividad NK y la producción de citocinas (Ganea y col.; Advances in Neuroimmunology 1996,6:61).

El péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP) es un miembro de la familia de péptidos de la secretina/VIP/glucagón del que se conocen dos formas moleculares PACAP-38 Y PACAP-27, cuyas secuencias son respectivamente (Ogi K y col.; Biochemical and Biophysical Research communication 1993,196:1511):

PACAP-38

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-
Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-
Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-
Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys-NH_2

PACAP-27

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-
Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-
Lys-Thy-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-NH_2

Ambos péptidos están ampliamente distribuidos en el sistema nervioso central y periférico.

También hay células productoras de PACAP en pulmón, células B pancreáticas e intestino (Arimura A; Regulatory Peptides 1992, 37:287). En el sistema inmune se ha descrito una gran abundancia de células positivas para PACAP en órganos linfoides centrales y periféricos (Gaytan F y col.; Cell and Tissue Research 1994, 276:233). Para el PACAP se han descrito tres

tipos de receptores (Shivers BD y col.; Endocrinology 1991,128:3055; Inagaki N y col.; Proceeding of the National Academy of Sciences USA 1994, 91:2679): el receptor de PACAP tipo I (PACAP-R-I) con igual afinidad para el PACAP-38 y el PACAP-27, pero que posee una afinidad de 300 a 1000 veces menor por el VIP; el receptor de PACAP tipo II (PACAP-R-II) que reconoce con la misma afinidad al VIP, PACAP-38 y PACAP-27 por lo que se le denomina receptor común de VIP-PACAP y corresponde al receptor de VIP VIP1-R, y el receptor de PACAP tipo III (PACAP-R-III) que corresponde al receptor de VIP VIP2-R. Hasta el momento, son escasos los estudios sobre las acciones biológicas del PACAP en el sistema inmune. Los efectos del PACAP son en muchos casos similares a los del VIP modulando la función fagocífica y las respuestas proliferativas.

Descripción de la invención

El objeto de esta invención es desarrollar preparados de VIP, PACAP y análogos como agentes terapéuticos en el tratamiento del shock endotóxico.

El tratamiento consiste en la administración a mamíferos, que lo necesiten, de una cantidad efectiva de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El VIP y el PACAP tienen efectos anflinflamatorios e inhiben la producción de IL-1, IL-6 y TNF-, en modelos animales de inducción de shock endotóxico. Al jugar estas citoquinas un papel importante en el desarrollo de dicho síndrome, VIP y PACAP pueden utilizarse para regular su producción.

Se sabe que la mayoría de los efectos del shock endotóxico están mediados por la activación del sistema inmune y los mecanismos inflamatorios del huésped como respuesta a los productos bacterianos. Los macrófagos juegan un papel muy relevante en este proceso pues tras su activación producen factores como óxido nítrico, prostaglandinas y citoquinas responsables de síntomas tales como fiebre, hipotensión, microcoagulación diseminada, fallo orgánico múltiple y eventualmente la muerte. En este sentido se han descrito elevados niveles circulantes de TNF, IL-1 e IL-6 asociados a endotoxemia. En modelos animales estos síntomas se reproducen tanto por la administración de endotoxinas bacterianas (LPS) como por la inyección de TNF e IL-1. Otros estudios han puesto de manifiesto el valor diagnóstico en cuanto a probabilidad de supervivencia que representan los niveles circulantes de IL-6.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es producido por varios tipos celulares que incluyen monocitos y macrófagos, linfocitos T y B, neutrófilos, células cebadas, células tumorales y fibroblastos. Es un importante factor regulador de otras citocinas pro-inflamatorias, como son IL-1β, IL-6 e IL-8. El TNFα induce la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales, activa a los leucocitos para que destruyan los microorganismo s, actúa sobre los hepatocitos para aumentar la síntesis de proteínas séricas que contribuyen a la respuesta de fase aguda y activa el sistema de coagulación. Su sobreproducción conduce a enfermedadades inmunopatológicas, autoinmunidad e inflamación.

La IL-6 es una citoquina multifuncional producida tanto por linfocitos como por células no linfoides. Regula varios aspectos de la respuesta inmune, como la producción de proteínas que median la fase aguda y la hematopoyesis. Además actúa como mediador en la respuesta inflamatoria. Su producción está regulada por varios factores, que incluyen TNFα, IL-1 y endotoxina bacteriana (LPS).

Se han ensayado estrategias de neutralización de estas citoquinas en el tratamiento del shock endotóxico pero los resultados no muestran que se produzca una mayor supervivencia a largo plazo. Un tratamiento que inhiba la producción de TNF e IL-6 representaría una considerable mejora en la evolución del shock endotóxico y en las probabilidades de supervivencia. La administración de VIP y PACAP en modelos animales consigue estos efectos y nuestro invento consiste en la utilización de un tratamiento con estos neuropéptidos para aumentar la supervivencia en cuadros de shock endotóxico.

Descripción de las figuras

La Figura 1 representa la producción de TNFα por parte de macrófagos murinos en cultivo (5x10^5 células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8} M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 2 representa la producción de TNFα por parte de macrófagos murinos en cultivo (5x10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8}M de VIP o PACAP.

La Figura 3 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5x10^5 células/ml) estimuladas con 10ngr/ml de LPS en presencia o ausencia de 10^{-8}M de VIP o PACAP a lo largo de 24 horas.

La Figura 4 representa la producción de IL-6 por parte de macrófagos murinos en cultivo (5x10^5 células/ml) después de 6 horas en cultivo con 10ngr/ml de LPS y a los que se añadió, a distintos tiempos, 10^{-8}M de VIP o PACAP.

La Figura 5 presenta el análisis por "Northern blot" para la presencia de mRNA de TNFα e IL-6 en macrófagos estimulados con LPS en presencia o ausencia de VIP o PACAP (18S representa el correspondiente rRNA como control de la cantidad total de RNA cargada).

La Figura 6 representa la supervivencia de ratones inyectados con 400μgr. de LPS y simultáneamente o a los 30 minutos, 1 ó 4 horas con 5nmol. de VIP o PACAP.

A. Control; B: VIP a 0 h.; C: VIP a 0,5 h; D: VIP a 1 h.; E: VIP a 4 h.;

Modo de realización de la invención

Los ejemplos que siguen son sólo para ilustrar los resultados conseguidos y no limitan la utili-

zación del invento que se detallan en las reivindicaciones especificadas.

Ejemplo 1

VIP y PACAP inhiben la producción de TNFα en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de TNFα en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 60 % y se produce con dosis de estimulación entre 1-10 ngr./ml de LPS. La IC_{50} es de unos 80 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 1). El efecto inhibidor es el mismo si ambos neuropéptidos se añaden hasta 1 hora después de estimular los macrófagos con LPS, aunque disminuye progresivamente hasta desaparecer si se añaden después de 4 horas (ver Figura 2).

Ejemplo 2

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de TNFα después de la inyección de LPS

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de TNFα 2 horas después de la inyección de 25 μgr. de LPS se aproximaron a los 4 ngr./ml. La administración simultánea de 5 nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60 %.

Ejemplo 3

VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos estimulados con LPS

En experimentos realizados "in vitro" VIP y PACAP inhiben la producción de IL-6 en macrófagos peritoneales murinos estimulados con LPS. El mayor grado de inhibición alcanza valores cercanos al 90 % y se produce con dosis de estimulación de 10 ngr./ml de LPS. La IC_{50} es de 8.6 pM, tanto para VIP como para PACAP y su efecto se observó hasta el final del experimento (ver Figura 3). El efecto inhibidor también se observa si los neuropéptidos se añaden después de la estimulación con LPS, aunque el grado de inhibición es progresivamente menor (ver Figura 4).

Ejemplo 4

VIP y PACAP reducen los niveles circulantes de IL-6 después de la inyección de LPS

En un experimento realizado con ratones los niveles circulantes de IL-6 2 horas después de la inyección de 25 μgr. de LPS se aproximaron a 1.5 ngr./ml. La administración simultánea de 5 nmol de VIP o PACAP redujeron dichos niveles un 60 % y un 75 % respectivamente.

Ejemplo 5

VIP y PACAP regulan la producción de TNFα e IL-6 a nivel transcripcional

Se sometieron macrófagos de ratón a las condiciones experimentales de los ejemplos 1 y 3 y se aisló su mRNA, que después se analizó mediante Northern blot para detectar mRNA de TNFα e IL-6. La Figura 5 muestra la ausencia de transcritos para TNFα o IL-6 cuando los macrófagos activados con LPS son expuestos además a VIP o PACAP.

Ejemplo 6

VIP y PACAP protegen de los efectos letales de LPS

Se realizó un experimento en el que se estudió la supervivencia a lo largo de un periodo de 4 días en ratones después de inyectarles 400 μgr. de LPS. Los resultados se reflejan en la Figura 6. La mortalidad en estas circunstancias fue del 100 % a las 36 horas. Con la administración simultánea de 5 nmol. de VIP o PACAP se consiguió una supervivencia del 60 % al final del experimento. La administración de los neuropéptidos hasta 1 hora después de la inyección de LPS todavía registró tasas de supervivencia cercanas al 50 %.

REIVINDICACIONES

1. Uso de un agente inhibidor de la producción del factor de necrosis tumoral (TNF) en la preparación de un fármaco para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos.

2. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

3. Uso según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

4. Uso de un agente inhibidor de la producción de la interleuquina 6 (IL-6) en la preparación de un fármaco para el tratamiento del shock endotóxico en mamíferos.

5. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el agente inhibidor es el péptido intestinal vasoactivo (VIP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

6. Uso según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el agente inhibidor es el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) o alguno de sus fragmentos o algún análogo derivado.

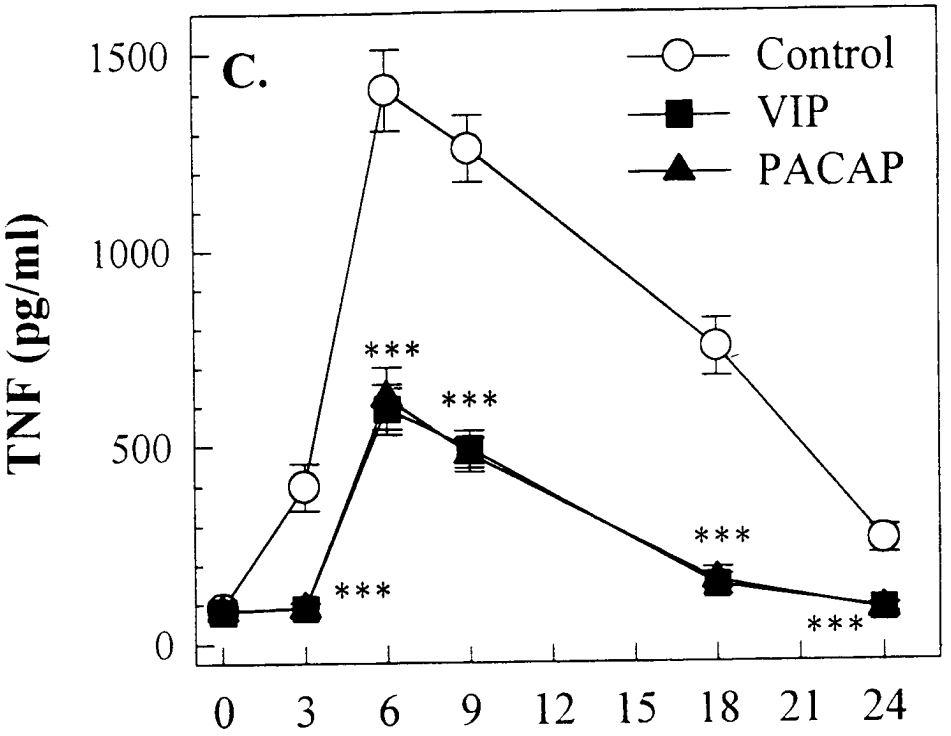

FIGURA 1

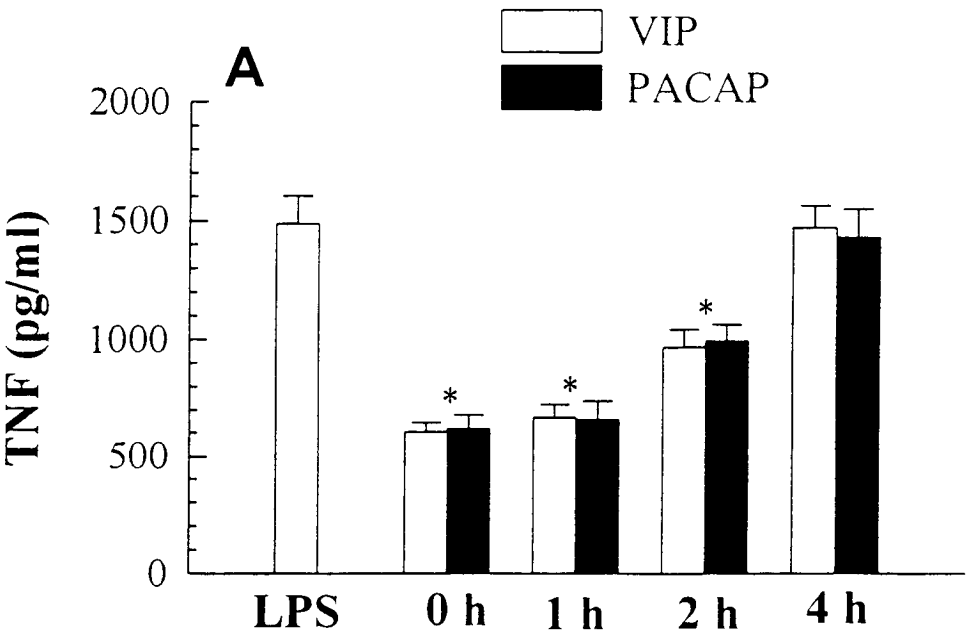

FIGURA 2

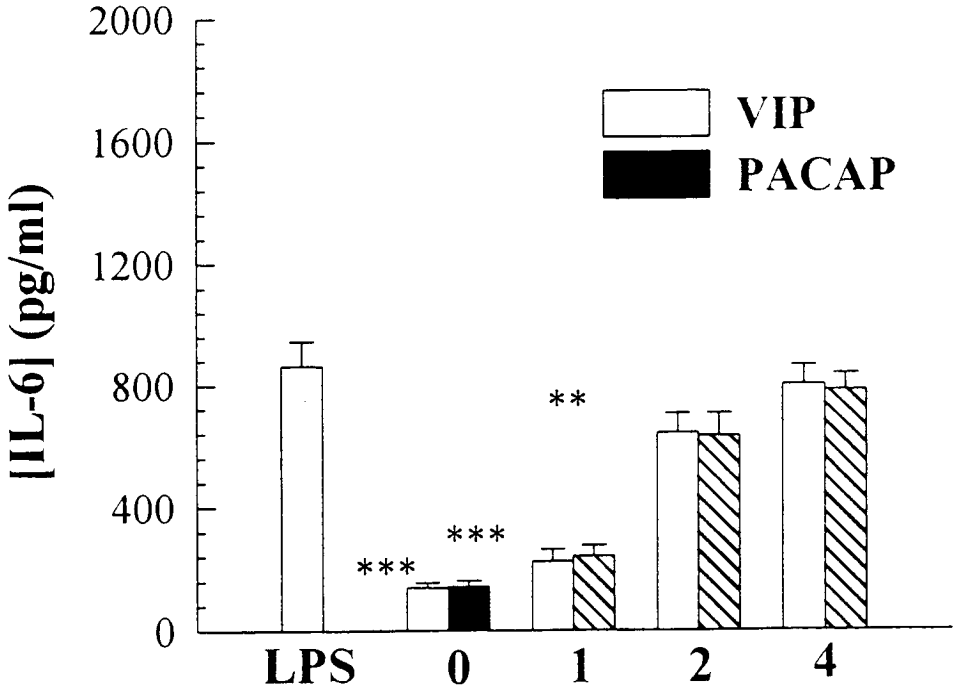

FIGURA 3

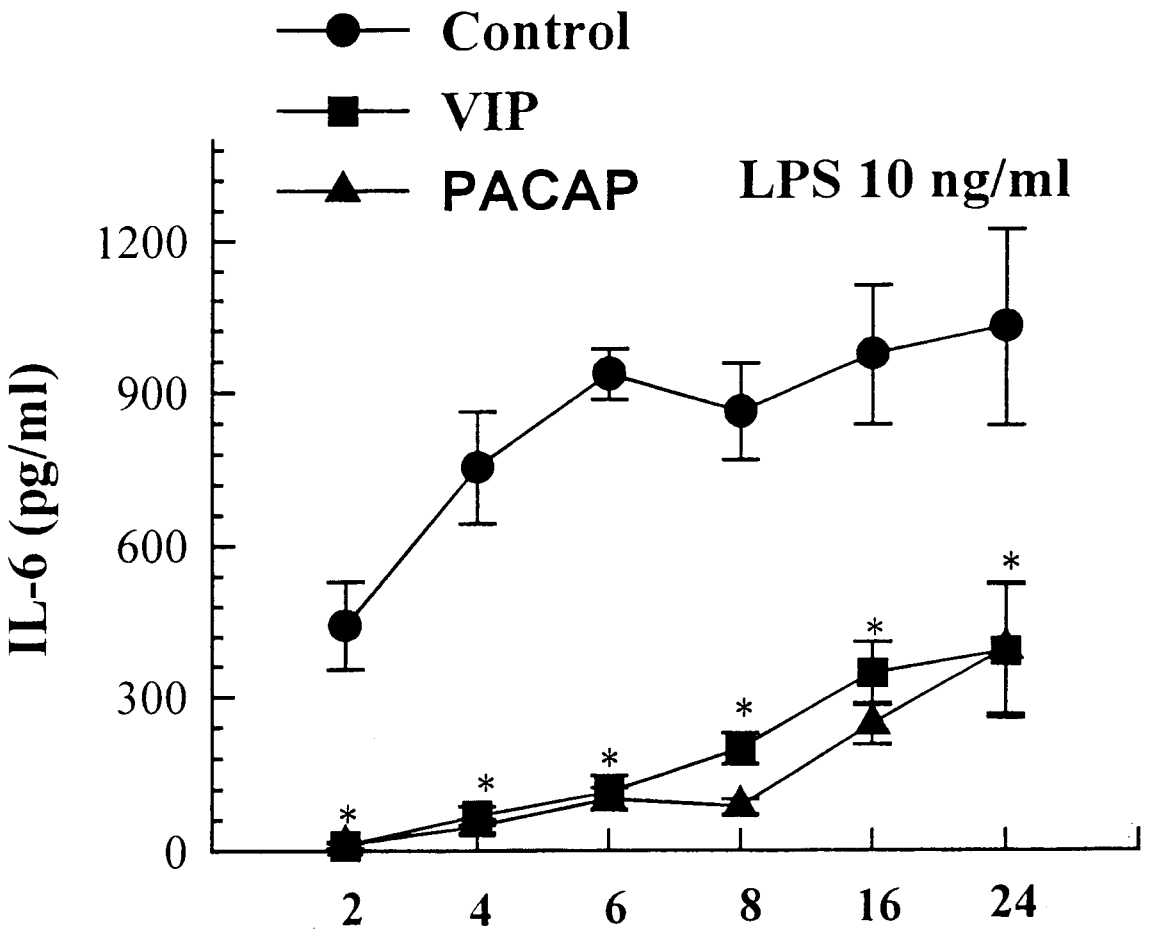
Control
VIP
PACAP
LPS 10 ng/ml
IL-6 (pg/ml)
1200
900
600
300
0
2
4
6
8
16
24
*

FIGURA 4

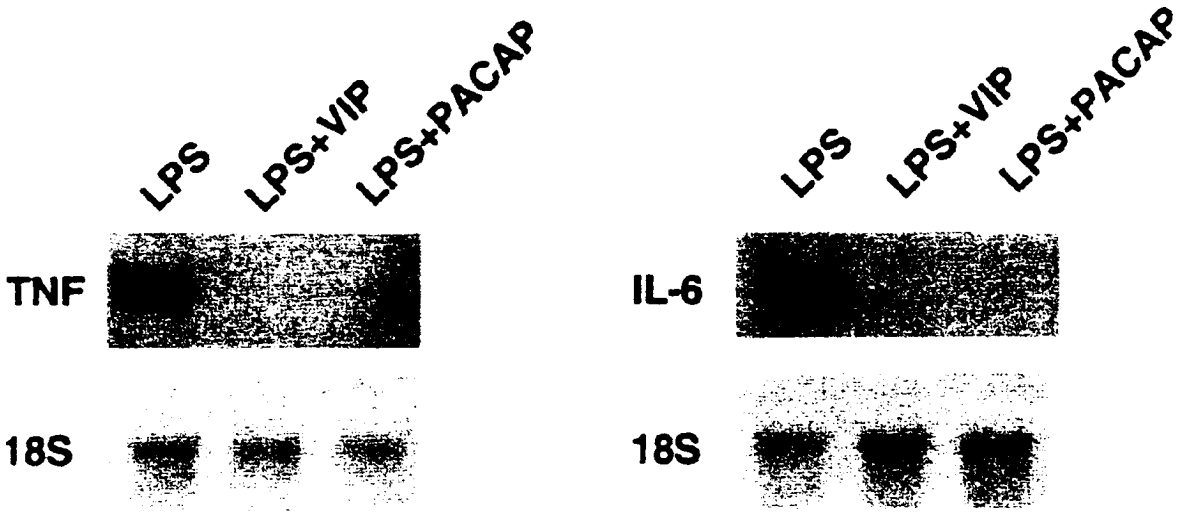

FIGURA 5

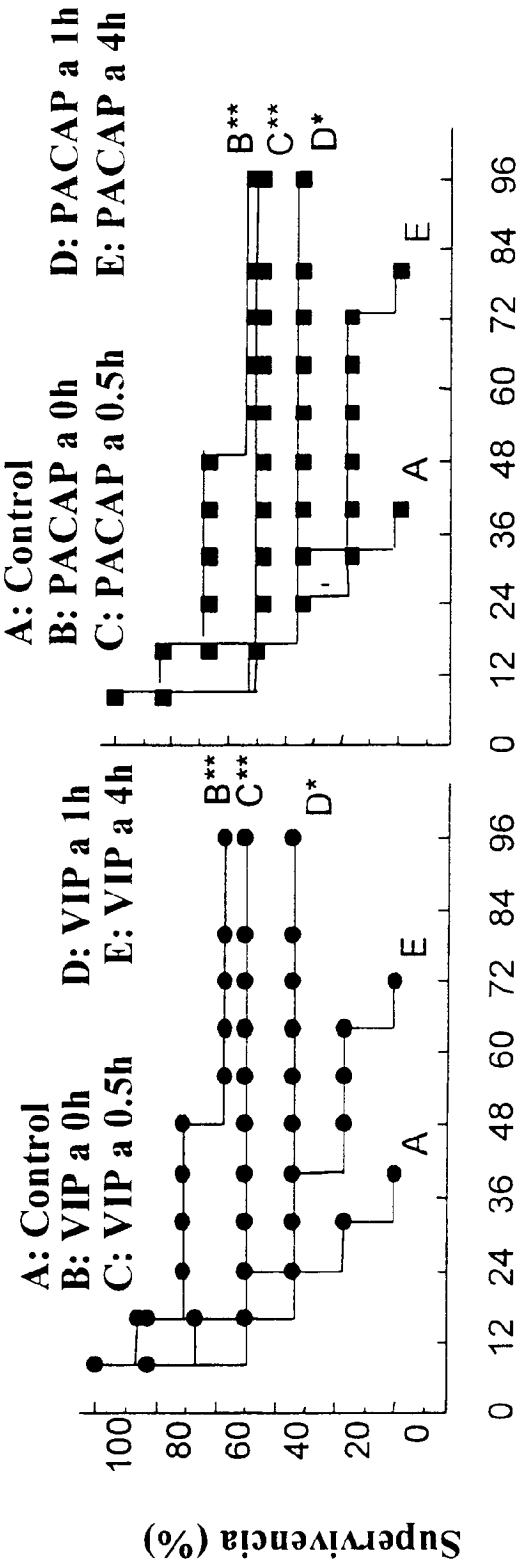
A: Control
B: VIP a 0h
C: VIP a 0.5h
D: VIP a 1h
E: VIP a 4h
A: Control
B: PACAP a 0h
C: PACAP a 0.5h
D: PACAP a 1h
E: PACAP a 4h
Supervivencia (%)
100
80
60
40
20
0
0
12
24
36
48
60
72
84
96
A
B**
C**
D*
E

FIGURA 6

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) ES 2 138 561

(21) N.° solicitud: 009800814

(22) Fecha de presentación de la solicitud: **17.04.1998**

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl.^{6}:** A61K 38/22

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 9620926 A1 (CELGENE CORPORATION) 11.07.1996, resumen.	1
X	VERHOEF, J. et al. "The role of cytokines in Gram-positive bacterial shock". TRENDS IN MICROBIOLOGY. Vol. 3, n° 4, Abril 1995, páginas 136-140, todo el documento.	1,4
X	BRONER, C.W. et al. "Cyclic nucleotides and vasoactive intestinal peptide production in a rabbit model of Escherichia coli septicemia". THE AMERICAN JOURNAL OF THE MEDICAL SCIENCES. Vol. 309, n° 5, Mayo 1995, páginas 267-277, todo el documento.	2,5
X	YOSHINOBU, S. et al. "Anti-shock effect of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on experimental endotoxia shock in dogs". LIFE SCIENCES. Vol. 54, n° 22, 1994, páginas 389-394, todo el documento.	3,6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica
O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

[×] para todas las reivindicaciones
[ ] para las reivindicaciones n°:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
28.10.1999	M. Novoa Sanjurjo	1/1