

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 813 379**

51 Int. Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.04.2014 PCT/EP2014/058012**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.10.2014 WO14173843**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2014 E 14721803 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2988769**

54 Título: **Tratamiento extracorporal del pulmón con un péptido cíclico de fórmula X₁-GQRETPEGAEAKPWY-X₂**

30 Prioridad:

23.04.2013 EP 13164828

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

23.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**FISCHER, HENDRIK;
PIETSCHMANN, HELMUT;
TZOTZOS, SUSAN JANE;
FISCHER, BERNHARD y
LUCAS, RUDOLF**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 813 379 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

Tratamiento extracorporeal del pulmón con un péptido cíclico de fórmula X_1 -GQRETPEGAEAKPWY- X_2

[0001] La presente invención se refiere a un proceso para el tratamiento extracorpóreo de pulmón de donante para mejorar las funciones pulmonares antes del trasplante.

5 **[0002]** En el trasplante de pulmón, parte o todo el pulmón enfermo se reemplaza por un pulmón sano de un donante fallecido para mejorar la calidad de vida o incluso el tiempo de supervivencia del receptor. Las indicaciones más comunes para el trasplante de pulmón son la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), que incluye enfisema, fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística. Otras indicaciones incluyen enfisema alfa1-anti-tripsina, hipertensión arterial pulmonar idiopática y sarcoidosis. La edad media de los donantes y receptores de pulmón es de
10 alrededor de 35 y 50 años, respectivamente. Las tasas de supervivencia de referencia no ajustadas oscilan entre aproximadamente 90% a los 3 meses y aproximadamente 30% a los 10 años para los trasplantes de pulmón en adultos. La supervivencia media general (o "semivida") es actualmente de unos 5,5 años. Las principales causas de muerte después del trasplante de pulmón en receptores adultos dentro de los primeros 30 días y en el primer año son el fallo del injerto y las infecciones sin citomegalovirus. Después de 1 año, la bronquiolitis obliterante (BOS) se
15 convierte en otro factor de riesgo importante de morbilidad y mortalidad (Am J Respir Crit Care Med. 2011 Nov 1;184 (9):1055-61).

[0003] La restauración del suministro de sangre a un órgano después de un período crítico de isquemia da como resultado una lesión parenquimatosa y una disfunción del órgano denominado lesión por reperfusión (RI). La lesión por isquemia reperfusión (IRI) a menudo se observa en trasplantes de órganos, resecciones de órganos mayores y en estado de shock. A pesar de los refinamientos en la preservación pulmonar y las mejoras en las técnicas quirúrgicas y la atención perioperatoria, la lesión pulmonar inducida por isquemia reperfusión sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad tempranas después del trasplante pulmonar. El síndrome generalmente ocurre dentro de las primeras 72 horas después del trasplante y se caracteriza por daño alveolar inespecífico, edema pulmonar e hipoxemia. El espectro clínico puede variar desde hipoxemia leve asociada con pocos infiltrados en la radiografía de tórax hasta una afección muy grave que requiere ventilación con presión positiva, terapia farmacológica y, en ocasiones, oxigenación por membrana extracorpórea (King RC et al, Ann Thorac Surg. 2000 Jun; 69 (6): 1681-5) Se han utilizado varios términos para describir este síndrome, pero lesión por isquemia-reperfusión se usa con mayor frecuencia, y el fallo primario del injerto se atribuye a la forma más grave de lesión que con frecuencia conduce a la muerte o ventilación mecánica prolongada más allá de las 72 horas. Además de la morbilidad y mortalidad significativas en el postoperatorio temprano, la lesión por isquemia-reperfusión severa también puede estar asociada con un mayor riesgo de rechazo agudo que puede conducir a la disfunción del injerto a largo plazo (Fiser SM et al, Ann Thorac Surg. 2002 Apr; 73 (4): 1041-7; discussion 1047-8).

[0004] El IRI se caracteriza por una oxigenación deficiente como criterio principal para la afección y también se caracteriza por un bajo cumplimiento pulmonar, edema intersticial / alveolar, infiltrados pulmonares en las radiografías de tórax, aumento de la resistencia vascular pulmonar, derivación intrapulmonar y lesión alveolar aguda, según lo revelado por alveolar difuso daño (IDAD) en patología. Clínicamente, los pacientes enfrentan ventilación prolongada, estadías prolongadas en la UCI y en el hospital en general, mayores costos médicos y mayor riesgo de morbilidad y mortalidad.

[0005] El trasplante de pulmón se ha convertido en el pilar de la terapia para pacientes que padecen enfermedad pulmonar en etapa terminal refractaria al tratamiento médico. Sin embargo, el número de pacientes incluidos en la lista de trasplante de pulmón excede en gran medida a los donantes disponibles. En todo el mundo solo se utilizan del 15 al 20% de los pulmones que se ofrecen de donantes con muerte cerebral, mientras que el 80% de los pulmones se rechazan porque no cumplen con los criterios de selección de donantes. El daño del pulmón del donante se manifiesta por hallazgos clínicos como un intercambio de gases deficiente o infiltrados en rayos X en el tórax que pueden conducir a disfunción del injerto y fallo después del trasplante. Se han recomendado varias estrategias para aumentar el número de pulmones de donantes. Algunos trasplantes de pulmón están vinculados a programas de donantes de pulmón relacionados con la vida, mientras que otros se centran en donantes que no son latidos del corazón como estrategias para finalmente ayudar a paliar la falta de donantes. Aunque los donantes vivos relacionados se han utilizado con éxito en algunos centros y se ha demostrado que el uso de donantes sin latidos cardíacos es factible en humanos, en general estas estrategias se han limitado a un pequeño número de pacientes debido a consideraciones técnicas, médicas y éticas.

[0006] Aunque el uso de pulmones donados extendidos ha llevado a un aumento gradual en las actividades generales de trasplante de pulmón en los últimos 10 años, algunos estudios han demostrado que el uso liberal de estos pulmones puede conducir a una estancia más prolongada en la UCI, una mortalidad temprana más alta y una espirometría peor tras un año (Kawut SM et al., Transplantation. 2005 Feb 15; 79 (3): 310-6; Pierre AF et al., J Thorac Cardiovasc Surg. 2002 Mar; 123 (3): 421-7; 4, 5).

[0007] Por lo tanto, cada donante se considera cuidadosamente individualmente y el riesgo que uno puede tomar al elegir un pulmón de donante extendido para trasplante siempre debe compararse con el riesgo de muerte del receptor mientras está en la lista de espera. Una evaluación precisa del pulmón del donante es un elemento clave en

- la selección de órganos que pueden usarse de manera segura para el trasplante. Desafortunadamente, la predicción de los resultados posteriores al trasplante utilizando los criterios de selección de donantes clínicos actuales es imprecisa y algunos criterios como la evaluación de la radiografía de tórax y los hallazgos de la broncoscopia son bastante subjetivos. La inexactitud de los parámetros clínicos en la determinación de los resultados posteriores al trasplante ocasionalmente conduce al uso de pulmones con lesiones no reconocidas que conducen a disfunción primaria grave del injerto (DGP). Más importante aún, se estima que alrededor del 40% de los pulmones que actualmente son clínicamente rechazados para trasplante podrían haberse utilizado de manera segura (Ware LB et al., Lancet. 2002 Aug 24; 360 (9333): 619-20) si hubiera sido posible una evaluación más detallada del órgano. Estos pulmones aumentarían significativamente la disponibilidad total de pulmón del donante.
- 5
- 10 **[0008]** Basado en la idea general de usar pulmones de donantes después de un paro cardíaco, la técnica de perfusión "ex vivo" (EVLP) se puede usar para evaluar la función pulmonar de los pulmones que de otro modo no podrían evaluarse "in vivo". Después de un corto período de 60 a 90 minutos de evaluación "ex vivo", el pulmón donado puede usarse con éxito en el trasplante de pulmón humano (Steen S et al., Ann Thorac Surg. 2007 Jun; 83 (6): 2191-48; Ingemansson R et al, Ann Thorac Surg. 2009 Jan; 87 (1): 255-60).
- 15 **[0009]** Otros estudios también han demostrado experimentalmente la viabilidad de la perfusión "ex vivo" a corto plazo con soluciones adecuadas para evaluar la función pulmonar en modelos animales y pulmones humanos clínicamente inadecuados (Rega FR et al., Ann Surg. 2003 Dec; 238 (6): 782-92; Erasmus ME et al., Transpl Int. 2006 Jul; 19 (7): 589-93; Egan TM et al., Ann Thorac Surg. 2006 Apr; 81 (4): 1205-1310-12).
- 20 **[0010]** Este concepto de técnica EVLP seguido de trasplante de pulmón se ha transferido con éxito a la práctica clínica. Sin embargo, hasta ahora EVLP se usaba solo para evaluar la función pulmonar del donante "ex vivo" y EVLP no se había usado para reacondicionar los pulmones del donante y / o administrar medicamentos terapéuticamente activos en el pulmón.
- [0011]** Los péptidos como se ejemplifican aquí ya se describen como productos farmacéuticos en
- WO 2006/013183 (administración de un péptido junto con un tensioactivo pulmonar),
 - 25 - WO 2010/099556 (tratamiento de hiperpermeabilidad),
 - WO 2011/085423 se describe (aplicación pulmonar o parenteral),
 - Parastoo et al., J. Med. Chem. 2010, 53, 8021-8029 (activation of the amiloride-sensitive sodium flow in A549 cells).
- [0012]** Sin embargo, el tratamiento pulmonar extracorpóreo no se describe en ninguna de estas publicaciones.
- 30 **[0013]** En Vadasz et al, Crit Car Med 2008, vol 36 no. 5, 1543-1550 y en Elia et al, Am J Resp y Crit Car Med 2003, vol 168, Nr. 9, 1043-1050 se describen modelos animales, en los que se trata un pulmón extracorpóreamente para mostrar la actividad de los péptidos utilizados. Un tratamiento extracorpóreo para mejorar las funciones pulmonares y el trasplante del pulmón así tratado en un receptor no está indicado ni previsto. Además, los pulmones tal como se usan de acuerdo con estas publicaciones son inapropiados para la reimplantación debido al daño de la barrera epitelial / endotelial.
- 35 **[0014]** Ahora se encontró sorprendentemente que los pulmones de los donantes pueden ser perfundidos y ventilados "ex vivo" antes de la implantación y que tales pulmones tratados ex vivo pueden ser acondicionados antes de la implantación mediante la administración de compuestos bioactivos para mejorar el rendimiento de ventilación del pulmón antes del trasplante.
- 40 **[0015]** En un aspecto, la presente invención proporciona un método para mejorar las funciones de un pulmón donante extracorpóreamente que comprende tratar un pulmón ex vivo con un compuesto ciclado de la secuencia de aminoácidos de fórmula
- $$X_1\text{-GQRETPEGAEAKPWY-X}_2 \quad |$$
- 45 donde
- X_1 comprende un aminoácido (secuencia) con 1 a 4, en particular 1 a 3 miembros, que comprende aminoácidos naturales o no naturales, en particular seleccionados del aminoácido (secuencia) C, KSP, K, ornitina, ácido 4-amino butanoico, β -alanina, y
- X_2 comprende un aminoácido, seleccionado de aminoácidos naturales, en particular seleccionado del grupo C, D, G
- 50 y E,
- y en donde
- X_1 comprende el aminoácido N-terminal en su primera posición izquierda y X_2 comprende el aminoácido C-terminal

en su última posición derecha.

[0016] Los aminoácidos naturales útiles en una secuencia de aminoácidos en un método de la presente invención son conocidos y comprenden por ejemplo, G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, C, U, Y, D, E, H, K, R.

5 **[0017]** Los aminoácidos no naturales útiles en una secuencia de aminoácidos en un método de la presente invención comprenden

- aminoácidos que tienen la estructura principal de aminoácidos naturales, pero que son distintos de los aminoácidos alfa,

10 - aminoácidos naturales en la forma D, es decir, distintos de la forma L natural, es decir, aminoácidos naturales, en los que el grupo alquilo no está en la configuración L, sino en la configuración D,

15 - aminoácidos no naturales que comprenden de 2 a 12, tales como de 2 a 6 átomos de carbono, al menos un grupo amino, por ejemplo uno o dos, y al menos un grupo carboxi, por ejemplo uno o dos, por ejemplo opcionalmente al lado de sustituyentes que están presentes también en aminoácidos naturales, tales como por ejemplo OH, -CONH₂, -NH-C(=NH₂)NH₂, SH, (C₁₋₄) alquil-S-, fenilo, heterociclilo, por ejemplo que comprende 5 o 6 miembros de anillo y que comprende al menos un heteroátomo seleccionado de N, O, S, preferiblemente N, por ejemplo uno o dos N, opcionalmente anillados con otro anillo, como fenilo, por ejemplo incluyendo prolinilo, indolilo, imidazolilo.

[0018] Los aminoácidos no naturales en una secuencia de aminoácidos en un método de la presente invención incluyen ortitina, ácido 4-aminobutírico, β-alanina.

20 **[0019]** En otro aspecto, un compuesto ciclado de la secuencia de aminoácidos de fórmula I incluye

- una secuencia SEQ ID NO: 1

Ciclo (CGQRETPEGAEAKPWYC)

en donde ambos residuos terminales de cisteína forman un puente disulfuro;

- una secuencia SEQ ID NO:2

25 Ciclo (KSPGQRETPEGAEAKPWYE)

en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al átomo de carbono ε del residuo de lisina N-terminal y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono γ del residuo de ácido glutámico C-terminal;

- una secuencia SEQ ID NO:3

Ciclo(KGQRETPEGAEAKPWYG)

30 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al átomo de carbono ε de la cadena lateral del residuo de lisina N-terminal y el grupo carboxilo del residuo de glicina C-terminal;

- una secuencia SEQ ID NO:4

Ciclo(ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG)

35 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al carbono δ de la cadena lateral del residuo de ornitina N-terminal y el grupo carboxilo del residuo de glicina C-terminal;

- una secuencia SEQ ID NO:5

Ciclo (ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD)

40 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino del residuo de ácido 4-aminobutanoico N-terminal y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono β del residuo de ácido aspártico C-terminal;

- una secuencia SEQ ID NO:6

Ciclo (β-alanina-GQRETPEGAEAKPWYE)

45 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino del residuo de β-alanina N-terminal (ácido 3-aminopropanoico) y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono γ del residuo de ácido glutámico C-terminal.

[0020] Una secuencia SEQ ID NO:7

Ciclo(CGQREAPAGAAAKPWYC)

5 en el que se forma un puente disulfuro entre ambos residuos de cisteína terminales, se preparó solo para comparación y no forma parte de la presente invención.

10 **[0021]** Un compuesto ciclado útil en un método según la presente invención se designa aquí también como "compuesto (s) ciclado (s) según la presente invención" e incluye un compuesto en cualquier forma, por ejemplo en forma libre y en forma de sal, por ejemplo en un entorno biológico, un compuesto de la presente invención normalmente está en forma de una sal.

[0022] En otro aspecto, un compuesto ciclado de la presente invención está en forma de una sal.

[0023] Dichas sales incluyen preferiblemente sales farmacéuticamente aceptables, aunque se incluyen sales farmacéuticamente inaceptables, por ejemplo para fines de preparación / aislamiento / purificación.

[0024] En el entorno biológico, una sal de un compuesto ciclado es normalmente un hidrocloreto.

15 **[0025]** Un compuesto ciclado en forma libre puede convertirse en un compuesto ciclado correspondiente en forma de una sal; y viceversa.

20 **[0026]** Un compuesto ciclado puede existir en forma de isómeros y mezclas de los mismos; por ejemplo, isómeros ópticos. Un compuesto ciclado de la presente invención puede, por ejemplo contienen átomos de carbono asimétricos y, por lo tanto, pueden existir en forma de enantiómeros o diastereoisómeros y mezclas de los mismos, por ejemplo, racematos. Un compuesto ciclado de la presente invención puede estar presente en la configuración (R)-, (S)- o (R, S)- preferiblemente en la configuración (R)- o (S)- con respecto a cada uno de los sustituyentes en tales átomos asimétricos de carbono en un compuesto ciclado de la presente invención. Las mezclas isoméricas se pueden separar según sea apropiado, por ejemplo de acuerdo, por ejemplo análogamente, a un método convencional, para obtener isómeros puros. La presente invención describe un compuesto en cualquier forma isomérica y en cualquier mezcla isomérica. En el caso de los aminoácidos naturales, la configuración de los sustituyentes es como en los aminoácidos naturales.

30 **[0027]** Se puede preparar un compuesto ciclado según sea apropiado, por ejemplo de acuerdo, por ejemplo análogamente, a un método convencional, por ejemplo o como se especifica en este documento, por ejemplo mediante síntesis de péptidos en fase sólida, opcionalmente de acuerdo con la estrategia de protección de fluorenilmetoxicarbonilo / t-butilo en resina de cloruro de 2-clorotritilo usando agentes de acoplamiento apropiados, tales como diisopropil carbodiimida y / o N-hidroxibenzotriazol y solvente apropiado, por ejemplo N, N-dimetilformamida. Los aminoácidos protegidos se pueden acoplar sucesivamente a la cadena peptídica, comenzando con el aminoácido C-terminal. La desprotección de los grupos protegidos con fluorenilmetoxicarbonilo se puede llevar a cabo con una base, por ejemplo piperidina, tal como piperidina al 20% en un disolvente apropiado, tal como N-N-dimetilformamida. La escisión del péptido completado, opcionalmente (parcialmente) protegido de la resina se puede llevar a cabo según sea apropiado, por ejemplo con un ácido, como el ácido acético en un disolvente apropiado, por ejemplo hidrocarburo halogenado, como CH₂Cl₂, por ejemplo ej. en una mezcla 1: 1 de ácido acético y CH₂Cl₂.

40 **[0028]** En el caso de péptidos que contienen cisteína, después de la escisión de la resina, se puede llevar a cabo la desprotección de la cadena lateral, si es necesario, por ejemplo con un ácido fuerte, como el ácido trifluoroacético (TFA), por ejemplo 95% TFA / 5% H₂O. La ciclación para obtener un enlace disulfuro puede llevarse a cabo mediante la oxidación de residuos de cisteína terminales, por ejemplo alcanzable por aireación del péptido lineal bruto a pH 8,5 durante 90 horas. El producto peptídico bruto obtenido puede purificarse, por ejemplo por cromatografía, por ejemplo por cromatografía líquida de presión media en fase inversa (RP-MPLC) en una columna apropiada, tal como una columna de gel de sílice RP-C18, usando convenientemente un gradiente de eluyente, tal como un gradiente de acetonitrilo acuoso del 5% al 40%. Se puede reemplazar un contraión de trifluoroacetato, por ejemplo por acetato, por ejemplo sobre una columna, como sobre una columna Lewatit MP64 (forma de acetato). Después de un lavado final en agua, el péptido purificado como sal de acetato se puede liofilizar y se puede obtener en forma de un color claro, por ejemplo polvo blanco.

50 **[0029]** En el caso de péptidos libres de cisteína, la etapa de ciclación puede llevarse a cabo según sea apropiado, por ejemplo todavía en el péptido lineal parcialmente protegido, después de la escisión de la resina. Después de la ciclación selectiva de los péptidos libres de cisteína, puede llevarse a cabo una desprotección de cadena lateral en TFA, si es necesario. Se puede llevar a cabo una etapa de purificación, por ejemplo, por cromatografía, por ejemplo por RP-MPLC preparativo. A partir del péptido así obtenido, puede llevarse a cabo la sustitución del ion trifluoro acetato por acetato, por ejemplo, como se describió anteriormente. La liofilización de la forma de acetato del péptido también se puede llevar a cabo, por ejemplo, en cuanto a los péptidos que contienen cisteína.

[0030] Las masas moleculares de los péptidos obtenidos pueden confirmarse mediante espectrometría de masas por ionización por electro pulverización o MALDI-TOF-MS. Se puede determinar la pureza, por ejemplo, por cromatografía líquida analítica de alto rendimiento.

5 **[0031]** Los compuestos ciclados, por ejemplo, incluyendo un compuesto de fórmula I, exhiben una actividad farmacológica interesante y, por lo tanto, son útiles como productos farmacéuticos. Por ejemplo, los resultados del estudio, como se indica en los ejemplos, demostraron que, tras la aplicación inhalatoria de un compuesto ciclado de la presente invención, mejoraron tanto la distensibilidad pulmonar dinámica como la diferencia de pO₂ arteriovenosa ΔpO₂ en los pulmones. También se demostró que la corriente de iones de sodio celular se potenciaba cuando se administraba un compuesto ciclado de la presente invención. Sorprendentemente, y a pesar de la secuencia de aminoácidos bastante similar en un compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 en comparación con los compuestos con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, el compuesto con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7 no mostró actividad en ensayos en los que los compuestos con las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 mostraron buena actividad.

15 **[0032]** Por lo tanto, un compuesto ciclado está indicado para acondicionar / mejorar las funciones pulmonares extracorpóreamente, por ejemplo, antes del trasplante.

[0033] Sorprendentemente, se descubrió que la administración de un compuesto ciclado en el mejor de los casos se puede realizar mediante administración inhalatoria, por ejemplo, administración que es adecuada para la administración inhalatoria, respectivamente, es decir, atomización (pulverización) sobre el tejido pulmonar.

20 **[0034]** Sorprendentemente, se descubrió que un transporte activo o pasivo de un compuesto ciclado, por ejemplo con (una de) las secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 a través del tejido pulmonar hacia la sangre, no es deseable y no debería suceder porque se descubrió que, si el compuesto ciclado llega al espacio aéreo pulmonar por inhalación oral, de modo que se separa en la superficie del tejido pulmonar y, por lo tanto, se activa el canal de iones de sodio sensible a amiloridas apicalmente orientado, contribuye en gran medida a la efectividad fisiológica de un compuesto ciclado de la presente invención, por ejemplo de las secuencias de aminoácidos SEQ ID 1 a SEQ ID 6.

25 **[0035]** Para eso, en primer lugar, un compuesto ciclado, por ejemplo, de (una de) las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 se disuelve en agua, para obtener una solución acuosa y la solución obtenida se filtra opcionalmente, por ejemplo, para eliminar impurezas. El filtrado obtenido está opcionalmente liofilizado, por ejemplo, para el caso de que se desee un formulario de almacenamiento. Sorprendentemente, se ha encontrado que un compuesto ciclado liofilizado de la presente invención así obtenido es estable durante un largo período. La estabilidad de los liofilizados se determinó después de hasta 24 meses a una temperatura de 2 a 8 ° C y hasta 6 meses a 25 ° C con una humedad relativa del 60%. Se utilizaron métodos analíticos habituales de laboratorio, por ejemplo, inspección visual y HPLC invertida.

30 **[0036]** Después de un almacenamiento de 24 meses a una temperatura de 2 a 8 ° C, también se determinó la actividad biológica del troquel mediante experimentos de Patch Clamp. Los liofilizados resultaron ser estables en las condiciones descritas, la apariencia no cambió, el contenido del péptido ciclado de fórmula I y la pureza mostraron solo pequeñas variaciones, si es que incluso. También la actividad biológica se mantuvo prácticamente sin cambios.

35 **[0037]** Las investigaciones de estabilidad de una solución acuosa de un compuesto ciclado con la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 se expone en la Tabla a continuación.

40

Parámetro	Temperatura de la jeringa de laboratorio de 2 a 8 ° C		Tanque de almacenamiento de un nebulizador Temperatura 25 ° C	
	T = 0	T = 7 días	T = 0	T = 24 horas
Apariencia	Solución clara		Solución clara	
Cantidad / contenido	25 mg / ml		25 mg / ml	
Pureza	96.3%	96.2%	96.6%	96.5%

[0038] Con la ayuda de nebulizadores, la solución acuosa de un compuesto ciclado de fórmula I, concretamente la de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, se transfirió a un aerosol. El tamaño de partícula de las gotas se

midió después de someter la solución acuosa a 3 nebulizadores diferentes y se expone en la tabla a continuación:

Nebulizador	Diámetro medio de partícula	Cantidad de partículas con $\varnothing \leq 5 \mu\text{m}$
Tipo A	4.7 μm	50%
Tipo B	3.3 μm	70%
Tipo C	3.7 μm	65%

[0039] Los experimentos apropiados podrían proporcionar evidencia de que estaba presente un compuesto ciclado de fórmula I en el tejido pulmonar, pero en la sangre prácticamente no después de la inhalación como un aerosol. Con la administración parenteral se descubrió que un compuesto ciclado de fórmula I estaba presente principalmente en la sangre.

[0040] Para administración por inhalación / pulverización, por ejemplo en forma de un aerosol, la solución acuosa de la primera etapa de disolución o el liofilizado obtenido, rediseñado en agua, se somete a pulverización (atomización) para obtener un aerosol, por ejemplo, mediante el uso de un nebulizador. Sorprendentemente, se encontró que la solución acuosa de un compuesto ciclado, por ejemplo, de (una de) las secuencias de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 también es estable durante un tiempo bastante largo, incluso sin la adición de estabilizadores y / o auxiliares que generalmente se usan. También se encontró que el tamaño de las gotas vaporizadas que comprenden un compuesto ciclado disuelto de la presente invención también puede tener una influencia ventajosa. Por ejemplo, en una realización preferida, el tamaño de gota de (la mayoría de) las gotas atomizadas no excede de 5 μm (límite superior), para obtener un resultado particularmente exitoso. El límite inferior apropiado del tamaño de gota depende solo de la viabilidad de las gotas.

[0041] Podría demostrarse en un estudio mediante el cual los efectos de un compuesto ciclado en particular con la secuencia de aminoácidos SEC ID N°: 1 sobre la función pulmonar de los pulmones de cerdo en un sistema extracorpóreo que simula el trasplante pulmonar, que mediante la administración por inhalación / pulverización, es decir, mediante el uso de un aerosol, se mejoraron la conformidad dinámica del pulmón, así como la diferencia de pO_2 arteriovenosa ΔpO_2 , por ejemplo como se muestra en la Fig. 2A y la Fig. 2B.

[0042] También se describe una composición farmacéutica, que comprende a, por ejemplo al menos un péptido de fórmula I en una forma, que es apropiada para rociar (inhalar) para obtener un aerosol, o que es apropiada para la preparación de un aerosol, qué aerosol es apropiado para rociar (inhalar), por ejemplo en donde el tamaño de las gotas no excede de 5 μm .

[0043] Fue sorprendente que en un aerosol proporcionado por la presente invención no es necesario que haya estabilizadores u otros auxiliares.

Descripción de las figuras

[0044]

La Fig. 1 muestra la actividad de los péptidos cíclicos de la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 en dependencia de la concentración aplicada. En el eje x, se indica la concentración en nM (escala logarítmica) de las proteínas cíclicas de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6, en el eje y la corriente de iones de sodio en %.

La Fig. 2 muestra los resultados de la aplicación inhalatoria de un péptido de la SEC ID N°: 1 durante la perfusión pulmonar extracorpórea (ex vivo), simulando el trasplante pulmonar.

[0045] En la Fig. 2A en el eje x, los puntos de tiempo T1 a T4 se indican donde se realizaron las mediciones, cada hora, y en el eje y la conformidad; y en la Fig. 2B en el eje x nuevamente los puntos de tiempo T1 a T4 y en el eje y el pO_2 arteriovenoso diferencia ΔpO_2 . Las mediciones se llevaron a cabo una vez cada hora después de la administración inhalativa del péptido SEQ ID NO: 1. Se usó agua para inyección (WFI) como control. Se muestran medias de 8 experimentos por grupo.

[0046] En los siguientes ejemplos, todas las temperaturas están en ° C (grados Celsius).

Ejemplo 1

Síntesis de péptidos

[0047] Todos los péptidos se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida de acuerdo con la estrategia de protección de fluorenilmetoxicarbonilo / t-butilo en resina de cloruro de 2-clorotritilo. Se usaron diisopropil carbodiimida y N-hidroxibenzotriazol como reactivos de acoplamiento. Todos los pasos de acoplamiento se llevaron a cabo en N-N-dimetilformamida. Los aminoácidos protegidos se acoplaron sucesivamente a la cadena peptídica, comenzando con el aminoácido C-terminal. La desprotección de fluorenilmetoxicarbonilo se llevó a cabo en piperidina al 20% en N-N-dimetilformamida. La escisión del péptido parcialmente protegido completo de la resina se llevó a cabo en una mezcla 1: 1 de ácido acético y diclorometano. En el caso de los péptidos que contienen cisteína, después de la escisión de la resina, se llevó a cabo la desprotección de la cadena lateral en ácido trifluoroacético al 95%, agua al 5%, seguido de ciclación por oxidación de los residuos de cisteína terminal, lograda por aireación del péptido lineal bruto a pH 8.5 por 90 horas. El producto peptídico bruto se purificó por cromatografía líquida de presión media en fase inversa (RP-MPLC) en una columna de gel de sílice RP-C18 con un gradiente de acetonitrilo al 5% - 40%. Finalmente, el contraión de trifluoroacetato se reemplazó 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 liofilizó y se obtuvo como un polvo blanco a blanquecino. En el caso de péptidos libres de cisteína, la etapa de ciclación se llevó 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 trifluoroacetato por acetato y la liofilización de la forma de acetato del péptido se llevó a cabo como para los péptidos que contienen cisteína. Las masas moleculares de los péptidos se confirmaron mediante espectrometría de masas por ionización por electropulverización o MALDI-TOF-MS y su pureza se determinó mediante cromatografía líquida analítica de alto rendimiento.

[0048] La pureza del péptido SEQ ID NO: 1 fue del 96,3%. m/z (ESI) 1924.2 (M ++ 1).

[0049] La pureza del péptido SEQ ID NO: 2 fue del 96,3%. m/z (ESI) 1924.2 (M ++ 1).

[0050] La pureza del péptido SEQ ID NO: 3 fue del 98,8%. m/z (ESI) 1888.2 (M ++ 1).

[0051] La pureza del péptido SEQ ID NO: 4 fue del 97,4%. m/z (ESI) 1873.4 (M ++ 1).

[0052] La pureza del péptido SEQ ID NO: 5 fue del 100%. m/z (MALDI-TOF) 1901.6 (M ++ 1).

[0053] La pureza del péptido SEQ ID NO: 6 fue del 100%. m/z (MALDI-TOF) 1902.7 (M ++ 1).

[0054] La pureza del péptido SEQ ID NO: 7 fue del 95%. m/z (MALDI-TOF) 1778.02 (M ++ 1).

Ejemplo 2

30 Evaluación de la bioactividad de un compuesto ciclado de la presente invención

[0055] Se llevaron a cabo experimentos en la línea celular epitelial humana A549 (ATTAC Nr. CCL-185) en los pasajes 80-90. Las células se cultivaron en la mezcla de medio / nutriente Eagle de Dulbecco F12 Ham, suplementado con suero bovino fetal al 10% y que contenía penicilina-estreptomina al 1%. Todos los medios de cultivo fueron adquiridos de Sigma-Aldrich GmbH (St. Louis, MO).

[0056] La bioactividad de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 sobre la corriente de iones de sodio se estudió en células A549 a temperatura ambiente (19-22 ° C) 24 a 48 h después del enchapado. Las corrientes se registraron con el método patch clamp en el modo de célula completa. Los cubreobjetos de vidrio con las células cultivadas se transfirieron a una cámara de 1 ml de capacidad, montada en la platina de un microscopio invertido (Zeiss, Axiovert 100). La cámara contenía 1 ml de la solución de baño de la siguiente composición (en mM): 145 NaCl, 2.7 KCl, 1.8 CaCl₂, 2 MgCl₂, 5,5 glucosa y 10 HEPES, ajustados a pH 7,4 con solución de NaOH 1 M. Las micropipetas se extrajeron de capilares de vidrio de borosilicato de paredes delgadas (World Precision Instruments, Inc., FL, USA) Con un extractor de micropipetas Flaming Brown (P87, Sutter Instruments, CA, USA) Y se pulieron en una microcuenca (Narishige, Tokio, Japón) para obtener resistencias de electrodos que van desde 2.0 a 3.5 MΩ. La solución de la pipeta contenía (en mM): 135 metanosulfonato de potasio, 10 KCl, 6 NaCl, 1 Mg₂ATP, 2 Na₃ATP, 10 HEPES y 0,5 EGTA (ácido etilenglicol tetraacético), ajustado a pH 7,2 con solución de KOH 1 M. Los productos químicos para pipetas y soluciones de baño fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Viena, Austria). Las mediciones electrofisiológicas se llevaron a cabo con un amplificador de pinza de conexión Axopatch 200B (Axon Instruments, CA, USA). Se seleccionaron los transitorios de capacidad y se compensó la resistencia en serie. Las corrientes de células enteras se filtraron a 5 kHz y se tomaron muestras a 10 kHz. La adquisición y el almacenamiento de datos se procesaron directamente en una PC equipada con el software pCLAMP 10.0 (Axon Instruments, CA, USA).

[0057] Después de la formación del sello GΩ, el período de equilibrio de 5 min fue seguido por registros de control a potenciales de mantenimiento (Eh) entre -100 y +100 mV en incrementos de 20 mV durante 1 min en cada Eh. Luego, alícuotas de una solución madre, que se preparó con agua destilada, se agregaron acumulativamente a la solución de baño, dando como resultado concentraciones que varían de 3.5 a 240 nM de péptidos SEC ID 1 a 6. La fase de lavado duró aproximadamente 1 minuto. Después de alcanzar el estado estacionario, se aplicó el mismo protocolo experimental para cada concentración del péptido y durante las grabaciones de control. Se ajustaron las

curvas de concentración-respuesta y los valores de CE50 y se estimaron las corrientes registradas a Eh de -100 mV con SigmaPlot 9.0. Las diferencias en la CE50 se calcularon para la significación estadística ($P < 0,05$) con la prueba t de Student. Para la evaluación de la selectividad de iones, la corriente de iones de sodio fue bloqueada por 10 a 100 μM de hidrocloreuro de amiloruro hidratado antes de la adición de péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7. La posterior adición de cloruro de tetraetilamonio (TEA) 10 mM indicó si los aumentos observados en la corriente se debieron a la corriente de potasio. Estos experimentos también se llevaron a cabo a Eh = -100 mV.

[0058] Los resultados de la determinación del efecto de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 sobre la corriente de iones de sodio medida en el ensayo de pinza de parche usando registros de células completas se muestran en la Tabla 1 que establece la actividad de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 en corriente celular de iones de sodio en el ensayo de patch clamp con línea celular A549 usando el modo de registro de células completas. La actividad de cada péptido en el ensayo se expresa como EC₅₀ (en nM) para cada péptido, donde EC₅₀ es la concentración efectiva a la que se observa el 50% de la actividad máxima (es decir, el aumento máximo en la corriente, I).

Tabla 1

Péptido	CE ₅₀ (nM)
SEC ID 1	54
SEC ID 2	56
SEC ID 3	38
SEC ID 4	45
SEC ID 5	24
SEC ID 6	19
SEC ID 7	ninguna actividad

[0059] Las curvas de dosis-respuesta obtenidas del ensayo de parche con la línea celular A549 usando el modo de célula completa para los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 se muestran en la Figura 1, en donde las curvas de concentración-respuesta de péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 en corriente de iones de sodio se puede ver. La corriente máxima de iones de sodio se ajustó al 100%. Para todos los péptidos de SEQ ID 1 a SEQ ID 6, se pudo observar un efecto máximo a una concentración de péptido de 120 nM.

[0060] El péptido SEQ ID NO: 7 no mostró actividad.

Ejemplo 3

Efecto de los péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 sobre la superficie celular desglicosilada

[0061] En experimentos en modo de células completas como se describió anteriormente, las células A549 se incubaron con la enzima "PNGasa F" (péptido-N⁴-(N-acetilo- β -D-glucosaminil) asparagina amidasa F) 100 unidades durante 1-5 minutos inmediatamente antes de las medidas de la abrazadera de parche y los portaobjetos de vidrio con las células cultivadas se enjuagaron con solución externa antes de transferirlos a la cámara del baño de 1 ml. Después de las grabaciones de control, se añadieron péptidos 240 nM SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 a la solución de baño.

[0062] Toda la corriente celular se registró a Eh = -100 mV de las células sin ningún tratamiento previo en condiciones de control y después de la adición de péptidos SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7, así como con pretratamiento con PNGasa F.

[0063] Los resultados de los experimentos de desglicosilación utilizando el ensayo de pinza de parche en modo de célula completa se presentan en la Tabla 2, en la que el efecto de la desglicosilación de células A549 sobre la activación de la corriente de iones de sodio por péptidos de SEC ID NO: 1 a SEC ID NO: 7 es indicado. Se registraron corrientes de células enteras a Eh = -100 mV. La concentración de péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 7 en solución de baño fue de 240 nM.

Tabla 2

Control / péptido	Pretratamiento con PNGasa F	Sin tratamiento previo con PNGasa F
Control	25.4 pA (n = 16)	
SEQ ID NO:1	19.6 pA (n = 3)	1073.3 ± 15,1 pA
SEQ ID NO:2	21.3 pA (n = 3)	(n = 10)
SEQ ID NO:3	20.6 pA (n = 3)	
SEQ ID NO:4	22.5 pA (n = 3)	
SEQ ID NO:5	22.4 pA (n = 3)	
SEQ ID NO:6	19.9 pA (n = 3)	
SEQ ID NO:7	sin actividad	ninguna actividad

[0064] Los resultados en la Tabla 2 muestran claramente que el pretratamiento de las células A549 con PNGasa F antes del ensayo de parche, abolió la capacidad de los péptidos de SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 6 para mejorar la corriente de sodio. En condiciones de control sin adición de péptido a la solución de baño y con un potencial de retención de -100 mV, la corriente de iones de sodio fue de 25.4 pA tanto en las células no tratadas como en las células pretratadas con PNGasa F. En las células no tratadas, la adición de péptidos SEQ ID NO: 1 a la SEQ ID NO: 6 (concentración final 240 nM) a la solución de baño a un potencial de retención de -100 mV dio como resultado corrientes sensibles de iones de sodio de más de 1,000 pA. Un péptido de SEQ ID NO: 7 no mostró actividad.

10 Ejemplo 4

Experimentos de trasplante de pulmón con cerdos

[0065] Los cerdos con muerte cerebral se colocaron en posición dorsal y se realizó una esternotomía longitudinal. El pericardio y ambas cavidades pleurales se abrieron. Las venas cavales superior e inferior estaban rodeadas. Se colocó un catéter de entrada en la arteria pulmonar a través de una bolsa en el tracto de salida del ventrículo derecho.

[0066] La oclusión de entrada se obtuvo ligando la vena cava superior e inferior, la oclusión de salida sujetando la aorta. Luego, los pulmones se preservaron con una solución de preservación isotónica fría de grado ante (50 ml por kg de peso corporal de cerdo, que contiene iones de potasio, iones de sodio, iones de magnesio, iones de calcio, iones de cloruro, dextrano, glucosa, iones tamponantes) a través de catéter de entrada. La incisión del apéndice auricular izquierdo proporciona flujo de salida. Los pulmones se ventilaron durante este período con un 50% de oxígeno, y se colocaron granizados helados tanto en cavidades pleurales como en mediastino.

[0067] La técnica de explantación fue la extracción en bloque con corazón y esófago de acuerdo con los siguientes pasos:

- a) Disección de puentes de tejidos blandos hacia la cavidad torácica a ambos lados de la tráquea.
- b) Transsección de ambos ligamentos pulmonares (exposición muy profunda y difícil), luego del VCI, la aorta descendente torácica inferior y el esófago, respectivamente.
- c) Separación roma de las adherencias mediastínicas restantes.
- d) Inflado completo del pulmón donante antes del cierre traqueal con una engrapadora.

[0068] Después de la explantación, los pulmones se envolvieron en una gasa, se colocaron en una bolsa de hielo aislada llena de solución extracelular de dextrano con bajo contenido de potasio y se almacenaron a 4 ° C durante 18 a 24 horas. Se sumergió una sonda de temperatura en el recipiente, que se colocará en un refrigerador.

[0069] Para el acondicionamiento pulmonar ex vivo, se utilizó la técnica EVLP (perfusión pulmonar extravascular). En la técnica EVLP, los pulmones donados se colocan en un circuito compuesto por una bomba, ventilador y filtros. Técnica EVLP, la temperatura puede aumentar hasta 37 ° C. En el EVLP, se usa un ventilador para suministrar

oxígeno a los pulmones. La bomba se usa para perfundir los pulmones con una solución extracelular que contiene albúmina humana y nutrición. Durante EVLP, la función pulmonar se puede evaluar regularmente en indicadores clave.

5 [0070] Para los experimentos experimentales de trasplante de pulmón de cerdo, el circuito EVLP se cebó con 2,0 litros de una solución de albúmina humana. Esta solución extracelular tenía una presión osmótica coloidal óptima. Después de que el circuito se des-aireó, el cebado se hizo circular a 20 ° C hasta que se conectó a los pulmones. Se añadieron heparina, cefuroxima metilprednisolona al perfusato.

10 [0071] La preparación del pulmón donante de cerdo comenzó con la sutura de un tubo silástico en forma de embudo con un catéter de control de presión incorporado en el manguito auricular izquierdo (LA) para entabillar la LA abierta y mantener un circuito cerrado de perfusión. Este tubo se anastomó de forma segura al manguito LA usando una sutura continua de monofilamento 5-0 para proporcionar un drenaje de salida confiable y efectivo. Se usó el mismo tipo de cánula para la canulación de la arteria pulmonar (PA), recortada según sea necesario para que coincida con el tamaño de la PA. Se realizó un lavado retrógrado de la mesa posterior utilizando 500 ml de solución extracelular tamponada. Antes de montar los pulmones del donante en el circuito EVLP, se abrió la tráquea y se realizó una succión bronquial directa para limpiar las vías respiratorias. Se insertó un tubo endo-traqueal (tamaño 8 mm ID) en la tráquea y se aseguró firmemente con una cinta umbilical. Posteriormente, los pulmones se transfirieron a la unidad de circuito EVLP. Primero, conectó la cánula LA al circuito e inició un flujo retrógrado lento para des-airear la cánula PA. Una vez que se completó la eliminación del aire, la cánula de PA se conectó al circuito y se inició un flujo anterógrado a 150 ml / min con el perfundido a temperatura ambiente. La temperatura del perfusato se aumentó gradualmente a 37 ° C durante los siguientes 30 minutos. Cuando se alcanzaron temperaturas de 32-34 ° C, se inició la ventilación mecánica de los pulmones de cerdo donado con el ventilador y se incrementó gradualmente la velocidad de flujo del perfundido.

25 [0072] El flujo de gas EVLP suministra oxígeno al pulmón y proporciona dióxido de carbono al perfundido de entrada (86% de N₂, 6% de O₂, 8% de CO₂) a través de la membrana de intercambio de gases (se inicia con un flujo de gas de 0,5 L / min y se titula basado en el perfusato de entrada pCO₂) para mantener el perfusato de entrada pCO₂ entre 35-45 mmHg. En el momento en que los pulmones se expandieron completamente, se aplicó una dosis única de AP301 (1 mg / kg en 5 ml de Agua), utilizando un sistema estándar de nebulización de líquido único en el pulmón de cerdo donado ventilado y perfundido por el sistema de circuito EVLP.

30 [0073] Durante los experimentos EVLP, la perfusión se evaluó constantemente. Los siguientes parámetros funcionales se midieron y registraron cada hora: flujo de la arteria pulmonar (PAF): L / min.

- presión (media) de la arteria pulmonar (PAP): mm Hg
- presión auricular izquierda (LAP): mm Hg
- resistencia vascular pulmonar (PVR = $[PAP-LAP] \times 80 / PAF$): dinas / seg / cm-5
- presión media, pico y meseta de la vía aérea (mAwP, pico AwP, platAwP): cm H₂O
- 35 • cumplimiento dinámico (mL / cm H₂O)
- análisis de gas perfusado: entrada (PA) y salida (PV) PO₂, PCO₂ y pH.

Resultados

[0074] Este estudio evaluó el efecto del péptido SEQ ID NO: 1 sobre la función pulmonar en un sistema extra corporal que simula el trasplante pulmonar.

40 [0075] Los resultados del estudio demostraron que, tras la aplicación inhalatoria, tanto la distensibilidad pulmonar dinámica como la diferencia de pO₂ arteriovenosa ΔpO_2 mejoraron en los pulmones tratados con un péptido de SEC ID N°: 1 como se muestra en la Fig. 2A y la Fig. 2B.

[0076] La aplicación pulmonar de un péptido de SEQ ID NO: 7 no proporcionó efectos de mejora en la función pulmonar.

45 **Ejemplo 5**

Experimentos de trasplante de pulmón con cerdos

[0077] Después del pretratamiento de los pulmones donantes con el péptido SEQ ID NO: 1 del Ejemplo 4, los pulmones se reimplantaron en los cerdos receptores. Poco después de la reperfusión del pulmón trasplantado, se administró el SEQ ID NO: 1.

50 [0078] Se realizó una toracotomía izquierda a través del sexto espacio intercostal, se preparó el hilio izquierdo. La vena hemiacigos en el lado izquierdo se diseccionó y seccionó, ya que oculta tanto la arteria pulmonar izquierda

como la aurícula izquierda. Después de la disección, los extremos ligados se pueden tirar para facilitar la exposición del campo OP. La arteria pulmonar derecha y los bronquios están rodeados. La neumonectomía izquierda se realizó con pinzas vasculares. Inmediatamente antes de la implantación, se aplicó una dosis intravenosa única de metilprednisolona (500 - 1000 mg) y una dosis baja de heparina (100 UI / kg, ver arriba). Luego se reimplantó el pulmón donante utilizando 4-0 PDS para la anastomosis bronquial y 5-0 Prolene para la arteria pulmonar y la anastomosis auricular izquierda. En los cerdos, hay un lóbulo adicional (lóbulo caval) del pulmón derecho con 2 venas en la aurícula izquierda (1 vena separada para el lóbulo caval, 1 vena adicional que surge del tronco de la vena principal derecha del lóbulo inferior). En la aurícula izquierda del donante, estas venas se han cerrado mediante suturas durante la separación de la mesa posterior para lograr la posibilidad de una línea de sutura / manguito auricular muscular. La sujeción separada de la parte izquierda de la aurícula izquierda es crítica, ya que es difícil encontrar el plano correcto para la abrazadera Satinsky. El cerdo tolera mal la sujeción de la aurícula izquierda, por lo tanto, la abrazadera debe liberarse inmediatamente después de completar la anastomosis auricular para reducir la presión pulmonar postcapilar del pulmón nativo derecho. Esto fue seguido por la anastomosis bronquial. La anastomosis arterial se realizó con un parche de la arteria pulmonar principal del donante en el tronco pulmonar receptor para asegurar una anastomosis amplia y un área de salida grande para el ventrículo derecho.

[0079] Después de terminar la anastomosis vascular, el pulmón implantado se enjuagó retro y luego se preparó de forma estándar. Posteriormente, la pinza arterial se soltó parcialmente durante 10 minutos proporcionando perfusión controlada.

[0080] Se tuvo cuidado de continuar la hipotermia tópica hasta la reperfusión. La ventilación al pulmón trasplantado se inició durante la reperfusión por modo estándar. La administración del péptido SEQ ID NO: 1 por nebulización (1 mg / kg en 5 ml de Aqua) se inició al comienzo de la ventilación en el animal receptor del grupo relevante.

[0081] El cofre permaneció abierto después de la reimplantación y el pulmón trasplantado se cubrió con una bolsa de plástico.

[0082] El pulmón del donante izquierdo se evaluó durante un período adicional de 24 horas.

[0083] Se han evaluado los siguientes parámetros:

Evaluación funcional de la función del injerto mediante parámetros de oxigenación: se realizaron análisis de gases en sangre arterial, así como análisis de gases en sangre selectivos de las venas pulmonares izquierdas cada 2 horas durante 24 h. Se calculó el índice respiratorio: $RI = PaO_2 / FiO_2$.

[0084] El cumplimiento pulmonar se calculó a partir de los datos de presión y volumen del ventilador de anestesia.

[0085] Evaluación de la función del injerto mediante la estimación de agua pulmonar extra vascular midiendo la relación de peso húmedo / seco.

[0086] Evaluación funcional de la función del injerto mediante mediciones hemodinámicas (mediciones en línea) y resistencia vascular pulmonar (PVR): la hemodinámica, incluida la presión arterial pulmonar (PAP) se midió continuamente. El gasto cardíaco (CO) se midió utilizando un catéter Swan-Ganz. La resistencia vascular pulmonar se calcula mediante la siguiente fórmula: $PVR (dynes.sec-1.cm-5) = (PAP - LAP) \times 80 / CO$.

Resultados

[0087] Este estudio evaluó el efecto del péptido SEQ ID NO: 1 sobre la función pulmonar después de la reimplantación.

[0088] El pretratamiento de los pulmones de los donantes con el péptido SEQ ID NO: 1 dio como resultado una mejor función inicial del injerto y mejor intercambio de gases, una reducción en el desarrollo del edema pulmonar y una tasa reducida de isquemia por reperfusión inducida por el mal funcionamiento del pulmón trasplantado.

Listado de secuencias

[0089]

45 <110> APEPTICO Forschung und Entwicklung GmbH
 <120> Proceso para tratamiento pulmonar extracorpóreo
 <130> A 18067
 <150> EP 13164828.9
 <151> 2013-04-23
 50 <160> 8

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> compuesto ciclado que tiene un puente disulfuro

<220>

<221> DISULFID

10 <222> (1)..(17)

<400> 1

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

Cys

15 <210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> compuesto ciclado que tiene un enlace amida formado entre el grupo amino unido al átomo de épsilon-C del residuo de lisina y el grupo carboxilo de cadena lateral unido a la gamma-C del residuo de ácido glutámico

<400> 2

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

Trp Tyr Glu

25

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> compuesto ciclado que tiene un enlace amida formado entre el grupo amino unido al átomo de épsilon-C de la cadena lateral del residuo de lisina y el grupo carboxilo del residuo de glicina

<400> 3

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

35 Gly

<210> 4

<211> 17

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

ES 2 813 379 T3

<220>

<223> compuesto ciclado que tiene un enlace amida formado entre el grupo amino unido al delta-C de la cadena lateral del residuo de ornitina y el grupo carboxilo del residuo de glicina

<220>

5 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X = ornitina

<400> 4

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

10 Gly

<210> 5

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> compuesto ciclado que tiene un enlace amida formado entre el grupo amino del residuo de ácido 4-aminobutanoico y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al beta-C del residuo de ácido aspártico

<220>

20 <221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X = ácido 4-aminobutanoico

<400> 5

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

Asp

<210> 6

30 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

35 <223> compuesto ciclado que tiene un enlace amida formado entre el grupo amino del residuo beta-alanina y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al C gamma del residuo de ácido glutámico

<220>

<221> MOD_RES

<222> (1)..(1)

<223> X = beta-alanina

40 <400> 6

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

Glu

<210> 7

<211> 17

ES 2 813 379 T3

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> compuesto ciclado que tiene un puente disulfuro

5 <220>
<221> DISULFID
<222> (1)..(17)

<400> 7
Cys Gly Gln Arg Glu Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ala Lys Pro Trp Tyr
1 5 10 15

Cys

10 <210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> compuesto ciclado de fórmula I

<220>
<221> MOD_RES
<222> (1)..(1)
20 <223> X = seleccionado de Cys; Lys-Ser-Pro; Lys; ornitina, ácido 4-aminobutanoico; beta-alanina

<220>
<221> MOD_RES
<222> (17)..(17)
<223> X = seleccionado de Cys; Áspid; Gly Glu

25 <400> 8
Xaa Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr
1 5 10 15

Xaa

REIVINDICACIONES

1. Un método para mejorar las funciones de un pulmón donante extracorpóreamente, que comprende tratar un pulmón *ex vivo* con un compuesto ciclado de la secuencia de aminoácidos de fórmula

5 $X_1\text{-GQRETPEGAEAKPWY-X}_2$ I

donde

X_1 comprende un aminoácido (secuencia) con 1 a 4, en particular 1 a 3 miembros, que comprende aminoácidos naturales o no naturales, y

10 X_2 comprende un aminoácido, seleccionado de aminoácidos naturales.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 en el que X_1 en un compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que comprende C, KSP, K, ornitina, ácido 4-amino butanoico y β -alanina.

3. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que X_2 comprende un aminoácido, seleccionado del grupo C, D, G y E.

15 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la ciclación se efectúa entre el primer residuo de aminoácido en X_1 y el último residuo de aminoácido en X_2 .

5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la ciclación se efectúa mediante un enlace amida o mediante un puente disulfuro.

20 6. Un método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que un compuesto de fórmula I se selecciona del grupo que consiste en

- SEQ ID NO:1

Ciclo(CGQRETPEGAEAKPWYC)

en donde ambos residuos terminales de cisteína forman un puente disulfuro;

- SEQ ID NO:2

25 *Ciclo*(KSPGQRETPEGAEAKPWYE)

en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al átomo de carbono ϵ del residuo de lisina N-terminal y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono γ del residuo de ácido glutámico C-terminal;

- SEQ ID NO:3

Ciclo(KGQRETPEGAEAKPWYG)

30 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al átomo de carbono ϵ de la cadena lateral del residuo de lisina N-terminal y el grupo carboxilo del residuo de glicina C-terminal;

- SEQ ID NO:4

Ciclo(ornitina-GQRETPEGAEAKPWYG)

35 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino unido al carbono δ de la cadena lateral del residuo de ornitina N-terminal y el grupo carboxilo del residuo de glicina C-terminal;

- SEQ ID NO:5

Ciclo (ácido 4-aminobutanoico-GQRETPEGAEAKPWYD)

40 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino del residuo de ácido 4-aminobutanoico N-terminal y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono β del residuo de ácido aspártico C-terminal;

y

- SEQ ID NO:6

Ciclo (β -alanina-GQRETPEGAEAKPWYE)

45 en donde se forma un enlace amida entre el grupo amino del residuo de β -alanina N-terminal (ácido 3-aminopropanoico) y el grupo carboxilo de cadena lateral unido al carbono γ del residuo de ácido glutámico C-terminal.

7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el compuesto ciclado de fórmula I está en forma de una sal.

8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un compuesto ciclado de fórmula I, en donde X_1 y X_2 son como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, se administra por pulverización.
- 5 9. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde un compuesto ciclado de fórmula I, en donde X_1 y X_2 son como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, se administra mediante el uso de un nebulizador.

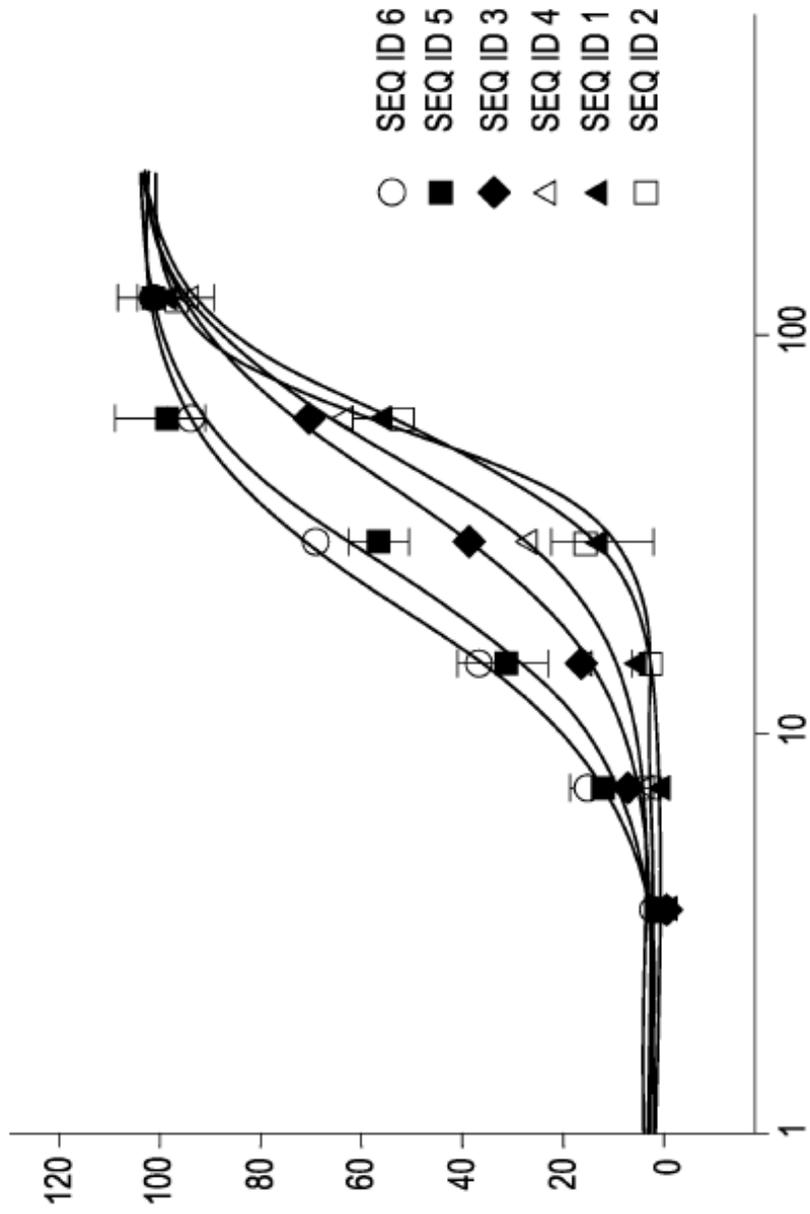


Fig. 1

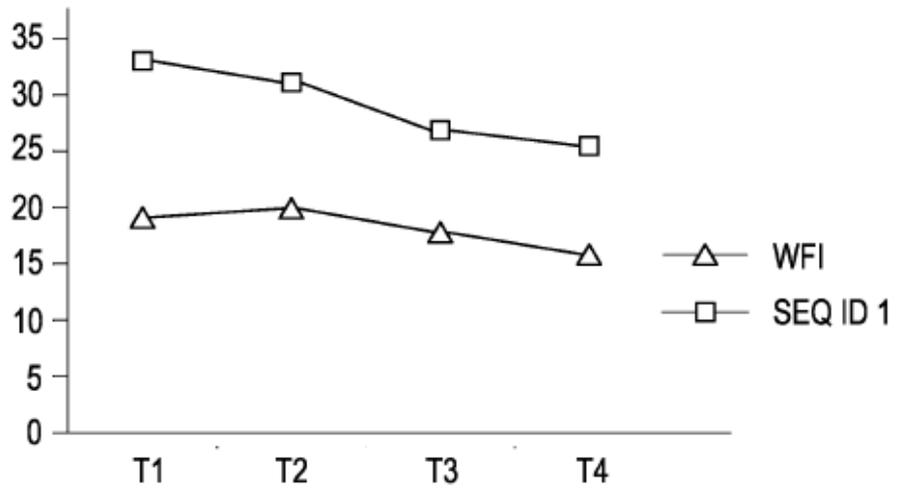


Fig. 2A

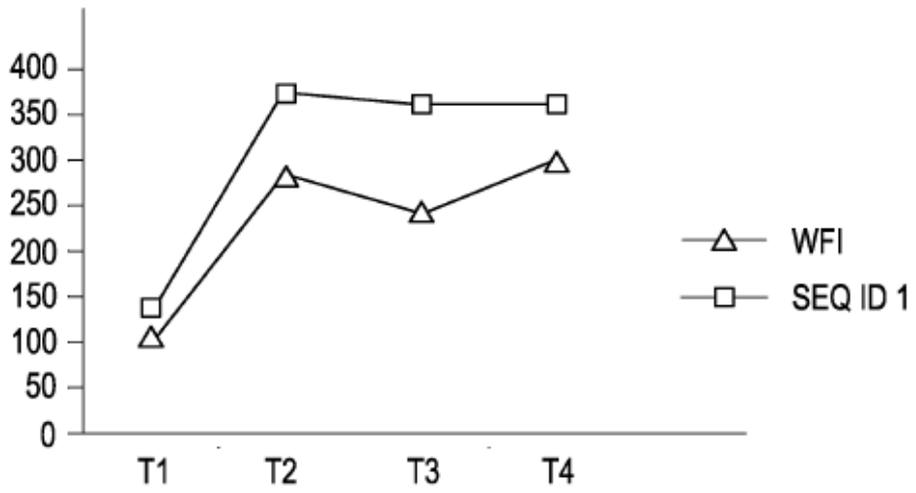


Fig. 2B