

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 818 824**

51 Int. Cl.:

A61K 38/22 (2006.01)

A61K 38/39 (2006.01)

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/443 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.05.2015 PCT/US2015/029926**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15172046**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.05.2015 E 15789718 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.07.2020 EP 3139949**

54 Título: **Composiciones que comprenden una proteína de fusión de VIP-ELP para su uso en el tratamiento de fibrosis quística**

30 Prioridad:

08.05.2014 US 201461990425 P

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

14.04.2021

73 Titular/es:

**PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
One Great Valley Parkway, Suite 30
Malvern, Pennsylvania 19355-1423, US**

72 Inventor/es:

**ARNOLD, SUSAN y
BALLANCE, DAVID JAMES**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 818 824 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

Composiciones que comprenden una proteína de fusión de VIP-ELP para su uso en el tratamiento de fibrosis quística

ANTECEDENTES

5 La fibrosis quística es un trastorno genético crónico, progresivo y mortal que afecta a aproximadamente 1 de cada 2500 personas en todo el mundo. Esta enfermedad es causada por mutaciones de pérdida de función en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que codifica un canal de aniones regulado por AMPc expresado principalmente en la membrana plasmática apical de células epiteliales secretoras en las vías respiratorias, páncreas, intestino y otros tejidos. Se han identificado casi 2000 mutaciones en el gen CFTR
10 que producen el fenotipo de pérdida de función por alteración de la traducción, procesamiento celular y/o apertura de los canales de cloruro (Rowe y Verkman (2013)).

Además de las mutaciones heredadas en el gen CFTR, factores ambientales, tales como el humo del tabaco, pueden conducir a defectos adquiridos de la proteína CFTR. El fenotipo de CFTR de pérdida de función conduce a la alteración del transporte de iones y de agua a través de la membrana celular. Por consiguiente, las células afectadas
15 producen moco anormalmente espeso que obstruye las vías respiratorias y las glándulas, que conduce a dificultad respiratoria, mayor infección, infertilidad, daño tisular y muerte.

Las terapias actuales se centran en aliviar los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR. Sin embargo, se necesitan terapias que corrijan el defecto subyacente de la proteína CFTR.

Tomasz Kowalczyk et al. World J. of Microbiology and Biotechnology, 30:8, pp. 2141-2152, 4 de abril de 2014, describe la aplicación de conjugados de ELP con la proteína tat de la proteína HV-1 o con derivado reactivo de doxorubicina para la administración de fármacos. S. Rafferty et al. J. of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 331:1, pp. 2-13, 7 de julio de 2009, describe un VIP para el rescate de canales de F508del-CFTR altamente funcionales en la membrana apical de células epiteliales CP. El documento de patente US2011/178017 describe proteínas de fusión de VIP-ELP para su uso en el tratamiento de hipertensión, enfermedad cardíaca o diabetes tipo 2. El documento de patente US2010/256044 describe péptidos VIP no mutantes y VIP sintéticos para su uso en el tratamiento de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), fibrosis quística (FQ) y bronquiolitis obliterante (BO). El documento de patente US2014/073667 describe potenciadores de CFTR tales como ivacaftor para su uso en el tratamiento de fibrosis quística.

SUMARIO DE LA INVENCION

30 La presente invención se define por las reivindicaciones pendientes.

La presente divulgación proporciona terapéuticos de péptido intestinal vasoactivo (VIP) para tratar, retrasar o mejorar los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR. La acumulación de moco pegajoso espeso en pacientes afectados da como resultado el daño tisular permanente, que incluye formación de tejido cicatricial (fibrosis). Este daño tisular conduce a una grave discapacidad en el paciente y a la muerte. La prevención, el retraso o la mejora de la formación de este moco pegajoso espeso pueden tratar la disfunción de la proteína CFTR.
35

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de la fibrosis quística que comprende administrar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

40 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento de síntomas de la disfunción de la proteína CFTR que comprende administrar a un paciente que lo necesite una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de aumento de la función de la proteína CFTR en un paciente que lo necesite que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

45 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de aumento de la función de CFTR que comprende administrar a un paciente con un defecto adquirido en la función de CFTR una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP). En algunos aspectos, el paciente adquirió un defecto en la función de CFTR al fumar. En algunos aspectos, el paciente con un defecto adquirido en la función de CFTR tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).

50 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de aumento de las velocidades de salidas de iones en las células de un sujeto con disfunción de la proteína CFTR que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de aumento de la frecuencia respiratoria en un sujeto con disfunción de la proteína CFTR que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

5 En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de disminución de la concentración de cloruro en el sudor en un sujeto con disfunción de la proteína CFTR que comprende administrar al paciente una composición farmacéutica que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

10 La **Figura 1** es un esquema que representa el mecanismo por el cual VIP aumenta la densidad de la membrana de la proteína CFTR. (1) La disociación de CFTR de CAL en el citoplasma para promover la inserción de membrana de CFTR; (2) Activación de la cascada de señalización de PKC ϵ que potencia la interacción del complejo NHERF1/PERMs con CFTR de membrana para mediar en su estabilidad superficial (Alshafie (2014)).

15 La **Figura 2A-D** muestra las velocidades de salida de yoduro de VIP (Panel **B**), PB1046 (Panel **C**) y PB1120 (Panel **D**). Se trataron células con las concentraciones indicadas durante 2 horas antes de la estimulación con una mezcla de activadores de AMPc. Se estimularon F508-delCFTR rescatados por una mezcla de activadores de AMPc añadida al tampón de salida del tiempo 3 a 15 minutos. El panel A muestra las velocidades de salida de yoduro de células JME/CF15 mantenidas a 37 °C en ausencia de correctores. Se indican la CE50 y las concentraciones estables (n=3-5) para cada compuesto.

20 La **Figura 3A-C** muestra las velocidades de salida de yoduro de células JME/CF15 mantenidas a 37 °C e incubadas con VIP, PB1046 o PB1120 como se indica durante 2 a 24 horas antes de la estimulación con una mezcla de activadores de AMPc. Se estimularon F508-delCFTR rescatados por una mezcla de activadores de AMPc añadida al tampón de salida desde el tiempo 3 a 15 minutos. Los paneles inferiores muestran el efecto de la adición del inhibidor de CFTR CFTR_{inh172} (20 μ M) 30 minutos antes y durante todos los experimentos de salida.

25 La **Figura 4A-B** muestra la corrección de la maduración de F508del-CFTR y la expresión en membrana. Se inmunotñeron células JME/CF15 para CFTR (A). El panel B muestra una inmunotransferencia de lisados de células mantenidas a 37 °C e incubadas con cada compuesto durante 24 horas.

30 La **Figura 5** muestra las velocidades de salida de yoduro medidas en células JME/CF15 tratadas con las siguientes condiciones antes de la estimulación con una mezcla de activadores de AMPc: (27C) 24 horas a 27 °C; (VIP) 37 °C + tratamiento con VIP 900 nM durante 24 horas; (PB1120) 37 °C + tratamiento con PB1120 1 μ M durante 24 horas; (PB1046) 37 °C + tratamiento con PB1046 1,2 μ M durante 18 horas; (VX809) 37 °C + tratamiento con VX809 1 μ M durante 24 horas; (VX661) 37 °C + tratamiento con VX661 3 μ M durante 24 horas. Se estimuló F508del-CFTR rescatado por una mezcla de activadores de AMPc.

35 La **Figura 6A-C** muestra las velocidades de salida de yoduro medidas en células JME/CF15 mantenidas a 37 °C. El panel **A** muestra que el tratamiento breve con VX770 1 μ M a 37 °C no produjo ninguna estimulación significativa en comparación con los niveles basales (p > 0,7). El panel **B** muestra el tratamiento con PB1046 350 nM durante 18 horas, solo o en combinación con el tratamiento breve con VX770 1 μ M. El panel **C** muestra el tratamiento con PB1120 140 nM durante 24 horas, solo o en combinación con el tratamiento breve con VX770 1 μ M. Se estimuló F508del-CFTR rescatado por una mezcla de activadores de AMPc. La administración de agentes juntos produjo un efecto sinérgico sobre la salida de yoduro.

40 La **Figura 7** muestra las velocidades de salida de yoduro medidas en células JME/CF15 mantenidas a 37 °C. Las células se trataron con PB1120 1 μ M durante 24 horas solas o en combinación con VX809 1 μ M durante 24 horas. La administración de los agentes juntos produjo un efecto sinérgico sobre la salida de yoduro.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

45 La fibrosis quística (FQ) es un trastorno genético recesivo caracterizado por la acumulación de moco pegajoso espeso que conduce a un aumento en la incidencia de infecciones y daño tisular en pacientes afectados. Los síntomas más comunes del trastorno incluyen daño progresivo al aparato respiratorio y problemas digestivos crónicos. La fibrosis quística es provocada por mutaciones en el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) que reducen o suprimen la actividad de la proteína resultante. La proteína CFTR es un canal de cloruro transmembrana localizado principalmente en las membranas luminal o apical de células epiteliales en una variedad de tejidos y órganos diferentes que incluyen los tejidos de las vías respiratorias, el intestino, el páncreas, el riñón, el conducto deferente y el conducto sudoríparo.

55 Actualmente se han identificado casi 2000 mutaciones en el gen CFTR que conducen a un fenotipo de pérdida de función. Por ejemplo, la mutación F508del, que está presente en al menos un alelo en aproximadamente 90 % de los pacientes con fibrosis quística, altera el plegamiento de CFTR, la estabilidad en el retículo endoplasmático y la

apertura de canales de cloruro (Rowe y Verkman (2013)). Otras mutaciones identificadas alteran, por ejemplo, la apertura de canales (por ejemplo, G551D), la conductancia (por ejemplo, R117H) o la traducción (por ejemplo, G542X).

5 Los sujetos también pueden adquirir un defecto en la función de la proteína CFTR (por ejemplo, al fumar). Por ejemplo, el humo del tabaco inhibe el transporte de cloruro en las células epiteliales bronquiales cultivadas y se observa actividad de CFTR reducida en fumadores sin mutaciones en el gen CFTR (Sloane (2012)). También se encuentran en los fumadores varios trastornos extrapulmonares asociados a la disfunción de CFTR, que incluyen pancreatitis idiopática, infertilidad masculina, caquexia y diabetes mellitus (Raju (2013)).

10 El fenotipo de CFTR de pérdida de función disminuye el movimiento de los iones cloruro a través de la membrana celular, que conduce a homeostasis aberrante de iones y fluido en las superficies epiteliales y daño a numerosos órganos y sistemas de tejido. Por ejemplo, en el pulmón, el defecto en el transporte de cloruro se acopla con la hiperabsorción de sodio, que conduce a la generación de moco espeso y deshidratado que permite infecciones bacterianas crónicas, y provoca bronquiectasia y destrucción progresiva de las vías respiratorias, que conducen con el tiempo a la pérdida de la función pulmonar. En el páncreas, el transporte alterado de los electrolitos conduce a la producción reducida de bicarbonato sódico y a una acumulación de moco que bloquea los conductos pancreáticos. Este bloqueo previene que las enzimas digestivas salgan del páncreas, causando problemas digestivos, y también daño tisular y fibrosis en el propio páncreas. En los pacientes con fibrosis quística, la fibrosis pancreática puede disminuir la producción de insulina, que conduce a diabetes mellitus relacionada con la fibrosis quística. En los intestinos, el transporte alterado de iones y de agua conduce a problemas digestivos crónicos, diarrea y síndrome de obstrucción intestinal distal.

25 El péptido intestinal vasoactivo (VIP) estimula el transporte de agua y de cloruro a través de las superficies epiteliales (Heinz-Erian (1985)) y se descubrió recientemente que desempeñaba una función en regular la estabilidad de las proteínas CFTR (Chappe y Said (2012)). La prolongada exposición a VIP puede rescatar el tráfico de F508delta-CFTR a la membrana celular apical y restaurar la función de proteínas (Chappe y Said (2012)). En la línea celular epitelial de las glándulas submucosas de las vías respiratorias Calu-3, la unión de VIP a uno de sus receptores, VPAC1, estimula la secreción de cloruro dependiente de CFTR mediante la activación de tanto las vías de señalización dependientes de PKA como de PKC (Chappe (2008); Derand (2004)). Esta cascada de señalización da como resultado que la proteína CFTR se ancle al citoesqueleto de actina, manteniendo así la proteína en la membrana y reduciendo su endocitosis (Chappe y Said (2012)). Como una proteína que tiene efectos sobre la corrección de la función de CFTR, VIP es un terapéutico atractivo para tratar enfermedades o trastornos asociados a la disfunción de la proteína CFTR, sin embargo, la mala estabilidad de los VIP después de la administración sistémica (por ejemplo, semivida de ≤ 1 minuto en circulación) ha limitado su aplicación clínica.

35 La presente divulgación proporciona un método de prevención, retraso o mejora de la aparición o la progresión de síntomas de disfunción de la proteína CFTR en sujetos administrando terapéuticos de péptido intestinal vasoactivo (VIP).

Péptidos intestinales vasoactivos

40 El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un neuropéptido de 28 aminoácidos que se une a dos receptores, VPAC1 y VPAC2, encontrados en una variedad de tejidos que incluyen las vías respiratorias, el intestino delgado, los testículos y el páncreas. El VIP y sus análogos funcionalmente y estructuralmente relacionados son conocidos por tener muchas funciones fisiológicas, que incluyen, relajación del músculo liso de las vías respiratorias actuando así de broncodilatador, estimulación de la secreción de fluido en las glándulas submucosas de las vías respiratorias y regulación de la secreción de agua y de electrolitos en los intestinos y el páncreas (Wine (2007); Wu (2011); Derand (2004)).

45 Las fibras nerviosas productoras de VIP se localizan conjuntamente con neuronas secretoras de acetilcolina que rodean las glándulas exocrinas (Lundberg (1980); Heinz-Erian (1986)). En las glándulas de sujetos con proteína CFTR funcional, VIP induce la secreción de fluido, pero esta inducción está alterada o está ausente en los pacientes con fibrosis quística (Joo (2002); Joo (2012)). Además, en las glándulas de las vías respiratorias humanas y porcinas, la administración de bajas concentraciones tanto de VIP como acetilcolina estimula la secreción de moco, pero esta sinergia se pierde en pacientes con fibrosis quística (Choi (2007)).

50 Como se muestra en la **Figura 1**, el VIP aumenta la inserción en membrana de CFTR, la estabilidad y la función en células epiteliales de las vías respiratorias humanas (Alshafie (2014)). En un modelo de inactivación de VIP murino, CFTR no se restringe a la membrana celular apical, sino que en su lugar sigue siendo principalmente intracelular (Chappe y Said (2012)). La ausencia de CFTR de la membrana apical está asociada con una patología pulmonar similar a la observada en los pacientes con fibrosis quística, con infiltración de células inflamatorias, engrosamiento de la pared alveolar y la mucosa bronquial, e hiperplasia de las células calcificiformes. La administración de VIP por vía intraperitoneal durante tres semanas restaura la localización de la membrana apical de CFTR y la estimulación de VIP prolongada aumenta el número de canales de CFTR en la membrana celular (Chappe (2008)). Este aumento en la densidad de CFTR apical, que ocurre mediante la estabilización de CFTR en la membrana, está asociado con un aumento en la función dependiente de CFTR como se mide por ensayos de salida de yoduro (Chappe (2008)).

En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones terapéuticas que pueden incluir uno o más péptidos de VIP diferentes. Por ejemplo, el péptido VIP puede comprender o consistir en un polipéptido que tiene SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un VIP sin la metionina del extremo N (por ejemplo, SEQ ID NO: 17). En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona un VIP con la metionina del extremo N (por ejemplo, SEQ ID NO: 14).

VIP maduro humano tiene 28 restos de aminoácidos con la siguiente secuencia: HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (SEQ ID NO: 17). VIP resulta del procesamiento de la molécula precursora de 170 aminoácidos prepro-VIP. Se han descrito estructuras de VIP y análogos a modo de ejemplo en las patentes de EE. UU. 4.835.252, 4.939.224, 5.141.924, 4.734.400, 4.605.641, 6.080.837, 6.316.593, 5.677.419, 5.972.883, 6.489.297, 7.094.755 y 6.608.174.

Se detallan varias mutaciones para mejorar la estabilidad del péptido frente a las proteasas, etc., en la bibliografía (véase Onune et al., *Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability*, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009). Por ejemplo, los péptidos VIP modificados incluyen las secuencias de SEQ ID NOS: 14-19. En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona péptidos VIP modificados que incluyen una o más de estas modificaciones. En algunas realizaciones, la presente divulgación proporciona péptidos VIP modificados que incluyen una o más de estas modificaciones y además incluyen modificaciones de VIP adicionales descritas en el presente documento.

En diversas realizaciones, la presente divulgación proporciona un VIP modificado (por ejemplo, que comprende SEQ ID NO: 14) o un análogo funcional como se describe en el presente documento. En general, los análogos funcionales de VIP incluyen fragmentos funcionales truncados en los extremos N o C por desde 1 hasta 10 aminoácidos, que incluyen por 1, 2, 3 o hasta aproximadamente 5 aminoácidos (con respecto a SEQ ID NO: 14). Dichos análogos funcionales pueden contener desde 1 hasta 5 inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos (conjuntamente) con respecto a la secuencia nativa (por ejemplo, SEQ ID NO: 17), y en cada caso retienen la actividad del péptido nativo (por ejemplo, mediante unión de VPAC2 y/o VPAC1). Dicha actividad se puede confirmar o ensayar usando cualquier ensayo disponible, que incluye un ensayo descrito en el presente documento, y que incluye cualquier ensayo adecuado para determinar o cuantificar una actividad descrita en Delgado et al., *The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation*, Pharmacol. Reviews 56(2):249-290 (2004). En estas u otras realizaciones, el componente de VIP del VIP modificado tiene al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % de identidad con la secuencia madura nativa (SEQ ID NO: 17). La determinación de la identidad de secuencia entre dos secuencias (por ejemplo, entre una secuencia nativa y un análogo funcional) se puede llevar a cabo usando cualquier herramienta de alineamiento, que incluye, por ejemplo, la desvelada en Tatusova et al., *Blast 2 sequences -a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250 (1999).

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona una molécula de VIP modificado que tiene preferencia de receptor por VPAC2 o VPAC1, en comparación con VIP no modificado (por ejemplo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14). Por ejemplo, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa por VPAC2 con respecto a VPAC1 de al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 500:1 o más. En otras realizaciones, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa por VPAC1 con respecto a VPAC2 de al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 500:1, o más. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, el VIP modificado activa el receptor de VPAC2 con una CE50 en un factor de aproximadamente 2 de VIP humano maduro no modificado (SEQ ID NO: 17). Sin embargo, este mismo VIP modificado es 50 o 100 veces o más menos potente que el VIP humano no modificado maduro en la activación del receptor de VPAC1. En algunas realizaciones, el VIP modificado puede tener preferencias de unión relativamente equipotentes por VPAC1 y VPAC2.

Dichas moléculas de VIP modificado pueden contener regiones de extremo N modificadas, tales como una adición de desde 1 hasta aproximadamente 500 aminoácidos a la histidina de extremo N de VIP, que puede incluir secuencias de aminoácidos de mamífero heterólogas. Por ejemplo, el VIP modificado puede contener una única metionina en el lado del extremo N de la histidina del extremo N natural de VIP maduro. Esto se puede preparar en *E. coli* u otro sistema de expresión bacteriano, puesto que la metionina no se retirará por *E. coli* cuando el aminoácido adyacente sea histidina. Alternativamente, el aminoácido del extremo N puede ser cualquiera de los aminoácidos que existen de forma natural, concretamente alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y prolina.

La secuencia adicional añadida al extremo N de VIP puede ser de cualquier secuencia, que incluye secuencias biológicamente activas y biológicamente inertes de desde 1 hasta aproximadamente 100, 1 hasta aproximadamente 50, 1 hasta aproximadamente 20, 1 hasta aproximadamente 10 y 1 hasta aproximadamente 5 aminoácidos.

El extremo N del VIP modificado puede tener la estructura M-N, donde M es metionina y N es el extremo N de la molécula de VIP (por ejemplo, SEQ ID NO. 14). Esta metionina soporta la traducción de la proteína en una célula

hospedadora bacteriana o eucariota. Así, el VIP modificado se puede preparar en un sistema biológico, que incluye sistemas de expresión bacterianos y de levadura (por ejemplo, *E. coli*). Mientras que la metionina se puede retirar algunas veces por metionina aminopeptidasa (MA) en sistemas de expresión bacterianos, la histidina (H) es uno de los restos menos favorecidos en la posición 2 para MA.

5 La semivida de terapéuticos de proteína se puede prolongar mediante una variedad de medios, que incluyen aumentar el tamaño y así el volumen hidrodinámico del terapéutico de proteína, añadir aminoácidos modificados o no naturales, conjugación de restos (por ejemplo pegilación), adición de secuencias sintéticas (por ejemplo, secuencias XTEN®, PASilation®), extensión del extremo carboxi de hCG (CTP), adición de secuencias de unión a albúmina (por ejemplo, AlbuAb®), conjugación de ácidos grasos de unión a albúmina y modificaciones
10 postraduccionales tales como N-glucosilación y fusión con otros péptidos. En otras realizaciones más, el VIP se modifica por fusión con una proteína heteróloga de mamífero, tal como una proteína de mamífero eficaz para prolongar la semivida de moléculas terapéuticas. Dichas secuencias pueden ser secuencias de mamífero, tales como albúmina, transferrina o secuencias de anticuerpo Fc. Dichas secuencias se describen en véase la patente de EE. UU. N° 7.238.667 (particularmente con respecto a los conjugados de albúmina), la patente de EE. UU. N°
15 7.176.278 (particularmente con respecto a los conjugados de transferrina) y la patente de EE. UU. N° 5.766.883. En algunas realizaciones, el VIP se modifica en el extremo N. En algunas realizaciones, el VIP se modifica en el extremo C.

En otras realizaciones, el VIP es activable por una peptidasa o proteasa, tal como una peptidasa o proteasa endógena. Dichas secuencias activables se describen en la solicitud internacional N° PCT/US2009/068656. Como
20 se usan en el presente documento, los términos "peptidasa" y "proteasa" son intercambiables. Por ejemplo, el VIP se puede diseñar para ser activable por una dipeptidil peptidasa. Las dipeptidil peptidasas a modo de ejemplo incluyen dipeptidil peptidasa-1 (DPP-I), dipeptidil peptidasa-3 (DPP-III), dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV), dipeptidil peptidasa-6 (DPP-VI), dipeptidil peptidasa-7 (DPP-VII), dipeptidil peptidasa-8 (DPP-VIII), dipeptidil peptidasa-9 (DPP-IX), dipeptidil peptidasa-10 (DPP-X). Se conocen secuencias de sustrato para dichas dipeptidasas.

25 En algunas realizaciones, el extremo N de un VIP activable puede tener la estructura Z-N, donde Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se retira por exposición a dipeptidasa) y N es el extremo N de VIP. El VIP activable puede tener una secuencia de extremo N con la fórmula M-X-N, donde M es metionina, X es Pro, Ala, o Ser, y N es el extremo N de VIP o análogo de VIP. De este modo, M y X serán sensibles a, y se retirarán por una célula hospedadora (por ejemplo, *E. coli*), y/o una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), posteriormente.
30 Alternativamente, la secuencia del extremo N de VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es el extremo N de VIP. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión de dipeptidasa expondrá N, el extremo N deseado del VIP o el análogo de VIP (por ejemplo, SEQ ID NO. 16). En dichas realizaciones, la proteína se puede producir por expresión de una construcción que codifica M-X1-X2-N (donde M es metionina) en una célula hospedadora (por ejemplo, *E. coli*), puesto que Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro en la segunda posición señalarán la retirada de Met, dejando así X1-X2 en el extremo
35 N, que se puede activar por una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV) *in vivo*. En algunas realizaciones, la peptidasa puede estar presente en el cuerpo y actúa sobre el VIP activable después de la inyección.

En otras realizaciones, el extremo N del VIP activable modificado tiene la estructura M-Z-N, donde M es metionina, Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se retira por exposición a dipeptidasa) y N es un extremo N no
40 de His de un VIP activo (VIP modificado). Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia de extremo N con la fórmula M-X-N, donde M es metionina; X es Pro, Ala o Ser; y N es un extremo N no de His del VIP activo. De este modo, M y X serán sensibles a, y se retirarán por una célula hospedadora (por ejemplo, *E. coli*) y/o una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), posteriormente. Alternativamente, la secuencia de extremo N del VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es un
45 extremo N no de His del VIP activo. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá N, el extremo N no de His deseado del VIP.

En aún otras realizaciones, el extremo N de un VIP activable modificado tiene la estructura M-Z-S-N, donde M es metionina; Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se retira por exposición a dipeptidasa); N es el
50 extremo N de VIP maduro (His); y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con peptidasa, y que proporcionan un VIP modificado como se describe previamente. Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia de extremo N con la fórmula M-X-S-N, donde M es metionina, X es Pro, Ala o Ser; N es el extremo N de VIP maduro; y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con peptidasa, y proporcionará preferencia de receptor. Alternativamente, la secuencia de extremo N del VIP activable puede ser X1-X2-S-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; N es un
55 extremo N no de His de VIP; y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con peptidasa. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá S.

En algunas realizaciones, las modificaciones químicas del extremo N al extremo N de VIP proporcionan preferencia por receptor. Se conocen bien en la técnica la modificación química de proteínas y métodos de la misma. Las modificaciones químicas a modo de ejemplo no limitantes son PEGilación, metilgloxalación, alquilación reductora, oxidación de ácido per fórmico, succinilación, aminoetilación y lipidación (Clifton, New Protein Techniques, New
60 Jersey: Humana Press, 1985. ISBX. 0-89603-126-8. Volumen 3 de Methods in Molecular Biology). Se pueden fijar

grupos químicos, tales como PEGilación, por modificaciones de cisteína, metionina, histidina, lisina, arginina, triptófano, tirosina, los grupos carboxilo se han descrito previamente (véase Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press, 1995).

Péptidos de tipo elastina

5 En algunos aspectos, la divulgación proporciona composiciones terapéuticas que incluyen un péptido intestinal vasoactivo y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP). En algunas realizaciones, un VIP y uno o más ELP se fusionan juntos. En algunas realizaciones, un VIP y uno o más ELP se producen como un polipéptido de fusión recombinante. En algunas realizaciones, la composición terapéutica incluye un péptido intestinal vasoactivo y uno o más ELP como moléculas separadas. En aún otras realizaciones, las composiciones incluyen una proteína de fusión de VIP-ELP y ELP como moléculas separadas. En algunas realizaciones, las composiciones incluyen SEQ ID NO: 15 (PB1046). En algunas realizaciones, las composiciones incluyen SEQ ID NO: 20 (PB1120).

15 La secuencia de ELP incluye unidades estructurales de péptido o secuencias que están relacionadas con, o imitan a, la proteína elastina. La secuencia de ELP se construye a partir de unidades estructurales de desde tres hasta aproximadamente veinte aminoácidos, o en algunas realizaciones, desde cuatro hasta diez aminoácidos, tales como cuatro, cinco o seis aminoácidos. La longitud de las unidades estructurales individuales puede variar o puede ser uniforme. Por ejemplo, las unidades estructurales incluyen unidades definidas por SEQ ID NOS: 1-13, que se pueden emplear como unidades estructurales de repetición, que incluyen unidades repetidas en tándem, o se pueden emplear en alguna combinación. Así, el ELP incluye esencialmente unidad(es) estructural(es) seleccionada(s) de SEQ ID NOS: 1-13.

20 En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la unidad de ELP es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 500 unidades estructurales, o en ciertas realizaciones aproximadamente 9 a aproximadamente 200 unidades estructurales, o en ciertas realizaciones aproximadamente 10 a 200 unidades estructurales, o en ciertas realizaciones aproximadamente 50 a aproximadamente 200 unidades estructurales, o en ciertas realizaciones desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 200 unidades estructurales, o desde aproximadamente 80 hasta aproximadamente 150 unidades estructurales, tales como una o una combinación de unidades definida por SEQ ID NOS: 1-13. Así, las unidades estructurales pueden tener conjuntamente una longitud de desde aproximadamente 50 hasta aproximadamente 2000 restos de aminoácidos, o desde aproximadamente 100 hasta aproximadamente 800 restos de aminoácidos, o desde aproximadamente 200 hasta aproximadamente 700 restos de aminoácidos, o desde aproximadamente 400 hasta aproximadamente 600 restos de aminoácidos, o desde aproximadamente 500 hasta aproximadamente 700 restos de aminoácidos. En realizaciones a modo de ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la unidad estructural de ELP incluye aproximadamente 3 unidades estructurales, aproximadamente 7 unidades estructurales, aproximadamente 9 unidades estructurales, aproximadamente 10 unidades estructurales, aproximadamente 15 unidades estructurales, aproximadamente 18 unidades estructurales, aproximadamente 20 unidades estructurales, aproximadamente 40 unidades estructurales, aproximadamente 80 unidades estructurales, aproximadamente 100 unidades estructurales, aproximadamente 120 unidades estructurales, aproximadamente 140 unidades estructurales, aproximadamente 144 unidades estructurales, aproximadamente 160 unidades estructurales, aproximadamente 180 unidades estructurales, aproximadamente 200 unidades estructurales, o aproximadamente 500 unidades estructurales. En realizaciones a modo de ejemplo, las unidades estructurales tienen conjuntamente una longitud de aproximadamente 45 restos de aminoácidos, de aproximadamente 90 restos de aminoácidos, de aproximadamente 100 restos de aminoácidos, de aproximadamente 200 restos de aminoácidos, de aproximadamente 300 restos de aminoácidos, de aproximadamente 400 restos de aminoácidos, de aproximadamente 500 restos de aminoácidos, de aproximadamente 600 restos de aminoácidos, de aproximadamente 700 restos de aminoácidos, de aproximadamente 800 restos de aminoácidos, o de aproximadamente 1000 restos de aminoácidos.

45 La secuencia de aminoácidos de ELP puede presentar una transición de fase inversa visible y reversible con la formulación seleccionada. Es decir, la secuencia de aminoácidos puede estar estructuralmente desordenada y ser altamente soluble en la formulación por debajo de una temperatura de transición (T_t), pero presentan una brusca transición de fase desorden a orden (intervalo 2-3 °C) cuando la temperatura de formulación aumenta por encima de T_t. Además de la temperatura, la longitud del polímero de aminoácidos, la composición de aminoácidos, la fuerza iónica, el pH, la presión, la temperatura, los disolventes seleccionados, la presencia de solutos orgánicos y la concentración de proteína también pueden afectar las propiedades de transición, y estas se pueden adaptar en la formulación para el perfil de absorción deseado. El perfil de absorción puede ser fácilmente probado determinando la concentración plasmática o la actividad del agente activo con el tiempo.

55 En ciertas realizaciones, el (los) componente(s) de ELP se pueden formar de unidades estructurales de multipéptidos (por ejemplo, tetrapéptidos, pentapéptidos, hexapéptidos, octapéptidos o nonapéptidos) que incluyen, pero no se limitan a:

(a) el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly, o VPGG (SEQ ID NO: 1);

(b) el tetrapéptido Ile-Pro-Gly-Gly, o IPGG (SEQ ID NO: 2);

- (c) el pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO: 3), o VPGXG, donde X es cualquier resto de aminoácido natural o no natural, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (d) el pentapéptido Ala-Val-Gly-Val-Pro, o AVGVV (SEQ ID NO: 4);
- 5 (e) el pentapéptido Ile-Pro-Gly-X-Gly, o IPGXG (SEQ ID NO: 5), donde X es cualquier resto de aminoácido natural o no natural, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (e) el pentapéptido Ile-Pro-Gly-Val-Gly, o IPGVG (SEQ ID NO: 6);
- (f) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-X-Gly, o LPGXG (SEQ ID NO: 7), donde X es cualquier resto de aminoácido natural o no natural, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (g) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-Val-Gly, o LPGVG (SEQ ID NO: 8);
- 10 (h) el hexapéptido Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly, o VAPGVG (SEQ ID NO: 9);
- (i) el octapéptido Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly, o GVGVPGVG (SEQ ID NO: 10);
- (j) el nonapéptido Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Gly-Ala-Gly, o VPGFVGAG (SEQ ID NO: 11);
- (k) los nonapéptidos Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Gly, o VPGVGVGG (SEQ ID NO: 12); y
- 15 (l) el pentapéptido Xaa-Pro-Gly-Val-Gly, o XPGVG (SEQ ID NO: 13) donde X es cualquier resto de aminoácido natural o no natural, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas.

Las unidades estructurales de multipéptido como se definen en SEQ ID NOS: 1-13 forman el componente de péptido de tipo elastina. En algunas realizaciones, el ELP incluye más de una unidad estructural. En algunas realizaciones, el ELP incluye dos o más unidades estructurales de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-13, que pueden estar en cualquier combinación. En algunas realizaciones, las dos o más unidades estructurales son las mismas y se repiten en tándem. En algunas realizaciones, las dos o más unidades estructurales son diferentes y se repiten alternativamente. En algunas realizaciones, el ELP incluye unidades estructurales repetidas en tándem para una o más porciones de secuencia, y también unidades estructurales diferentes repetidas alternativamente para otras porciones de la secuencia. En algunas realizaciones, el componente de ELP está formado completamente (o casi completamente) de una o una combinación de (por ejemplo, 2, 3 o 4) unidades estructurales seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-13. En otras realizaciones, al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 90 % del componente de ELP está formado de una o una combinación de unidades estructurales seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-13. En ciertas realizaciones, el ELP contiene unidades repetidas, que incluyen unidades repetidas en tándem, de Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO: 3), donde X es como se ha definido anteriormente, y donde el porcentaje de unidades de Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO: 3) tomadas con respecto a todo el componente de ELP (que puede comprender unidades estructurales distintas de VPGXG) es mayor que aproximadamente 50 %, o mayor que aproximadamente 75 %, o mayor que aproximadamente 85 %, o mayor que aproximadamente 95 % del ELP. El ELP puede contener motivos de 5 a 15 unidades estructurales (por ejemplo, aproximadamente 10 unidades estructurales) de SEQ ID NO: 3, variando el resto X huésped entre al menos 2 o al menos 3 de las unidades en el motivo. Los restos huésped se pueden seleccionar independientemente, tal como de restos no polares o hidrófobos, tales como los aminoácidos V, I, L, A, G y W (y se pueden seleccionar para retener una propiedad de transición de fase inversa deseada). En ciertas realizaciones, los restos huésped se seleccionan de V, G y A. En algunas realizaciones, el ELP incluye la serie ELP1 (VPGXG: V5A2G3). En algunas realizaciones, el ELP incluye la serie ELP4 (VPGXG: V-5). En algunas realizaciones, el ELP incluye una combinación de la serie ELP1 y ELP4. Sin desear quedar ligado a la teoría, las diferencias en la hidrofobia de los polímeros de ELP se determina por los restos huésped y sus relaciones, siendo la serie ELP4 más hidrófoba que la serie ELP1.

20

25

30

35

40

En ciertas realizaciones, el ELP contiene unidades repetidas, que incluyen unidades repetidas en tándem, de Xaa-Pro-Gly-Val-Gly (SEQ ID NO: 13), donde X es como se ha definido anteriormente, y donde el porcentaje de unidades de Xaa-Pro-Gly-Val-Gly tomadas con respecto a todo el componente de ELP (que puede incluir unidades estructurales distintas de XPGVG) es mayor que aproximadamente 50 %, o mayor que aproximadamente 75 %, o mayor que aproximadamente 85 %, o mayor que aproximadamente 95 % del ELP. El ELP puede contener motivos de 5 a 15 unidades estructurales (por ejemplo, aproximadamente 9 unidades estructurales) de SEQ ID NO: 13, variando el resto X huésped entre al menos 2 o al menos 3 de las unidades en el motivo. Los restos huésped se pueden seleccionar independientemente, tal como de restos no polares o hidrófobos, tales como los aminoácidos V, I, L, A, G y W (y se pueden seleccionar para retener una propiedad de transición de fase inversa deseada). En ciertas realizaciones, los restos huésped se seleccionan de V y A.

45

50

En ciertas realizaciones, el ELP contiene unidades repetidas, que incluyen unidades repetidas en tándem de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-13 tanto solos como en combinación. En una realización, el ELP contiene repeticiones de dos o más de cualquiera de SEQ ID NOS: 1-13 en combinación. En ciertas realizaciones, el ELP contiene repeticiones de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13. En algunas realizaciones, el ELP contiene repeticiones de SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 13, en donde los restos huésped están seleccionados independientemente, tal como de

55

restos no polares o hidrófobos, tales como los aminoácidos V, I, L, A, G y W (y se pueden seleccionar para retener una propiedad de transición de fase inversa deseada). En ciertas realizaciones, los restos huésped se seleccionan de V y A. En algunas realizaciones, el ELP comprende 9-meros que comprenden cinco copias de un pentapéptido desvelado en el presente documento. En algunas realizaciones, el ELP comprende 9-meros que comprenden SEQ ID NOs: 3 y 13 en cualquier combinación. En algunas realizaciones, el ELP comprende una secuencia que alterna entre SEQ ID NOs: 3 y 13.

En algunas realizaciones, el ELP puede formar una estructura de giro β . Las secuencias de péptidos a modo de ejemplo adecuadas para crear una estructura de giro β se describen en la solicitud de patente internacional PCT/US96/05186. Por ejemplo, el cuarto resto (X) en la secuencia VPGXG se puede alterar sin eliminar la formación de un giro β .

La estructura de ELP a modo de ejemplo se puede describir usando la notación ELPk [XiYj-n], donde k designa una unidad repetida de ELP particular, las letras en mayúsculas entre corchetes son códigos de aminoácidos unilíteros y sus subíndices correspondientes designan la relación relativa de cada resto X huésped en las unidades estructurales (si procede), y n describe la longitud total del ELP en el número de repeticiones estructurales. Por ejemplo, ELP1 [V₅A₂G₃-10] designa un componente de ELP que contiene 10 unidades repetidas del pentapéptido VPGXG, donde X es valina, alanina y glicina en una relación relativa de aproximadamente 5:2:3; ELP1 [K₁V₂F₁-4] designa un componente de ELP que contiene 4 unidades repetidas del pentapéptido VPGXG, donde X es lisina, valina y fenilalanina en una relación relativa de aproximadamente 1:2:1; ELP1 [K₁V₇F₁-9] designa un polipéptido que contiene 9 unidades repetidas del pentapéptido VPGXG, donde X es lisina, valina y fenilalanina en una relación relativa de aproximadamente 1:7:1; ELP1 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetidas del pentapéptido VPGXG, donde X es valina; ELP1 [V-20] designa un polipéptido que contiene 20 unidades repetidas del pentapéptido VPGXG, donde X es valina; ELP2 [5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetidas del pentapéptido AVGVP (SEQ ID NO: 4); ELP3 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetidas del pentapéptido IPGXG (SEQ ID NO: 5), donde X es valina; ELP4 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetidas del pentapéptido LPGXG (SEQ ID NO: 7), donde X es valina.

Con respecto a ELP, la Tt es una función de la hidrofobia del resto huésped. Así, variando la identidad del (de los) restos huésped y su(s) fracción (fracciones) molar(es), se pueden sintetizar ELP que presentan una transición inversa en un amplio intervalo. Así, la Tt a una longitud de ELP dada, se puede disminuir incorporando una mayor fracción de restos huésped hidrófobos en la secuencia de ELP. Los ejemplos de restos huésped hidrófobos adecuados incluyen valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y metionina. También se puede usar tirosina, que es moderadamente hidrófoba. En cambio, la Tt se puede aumentar incorporando restos, tales como los seleccionados de: ácido glutámico, cisteína, lisina, aspartato, alanina, asparagina, serina, treonina, glicina, arginina y glutamina.

Para polipéptidos que tienen un peso molecular > 100.000 Da, la escala de hidrofobia desvelada en el documento de patente PCT/US96/05186 proporciona un medio de predicción de la Tt aproximada de una secuencia de ELP específica. Para polipéptidos que tienen un peso molecular <100.000 Da, la Tt se puede predecir o determinar por la siguiente función cuadrática: $Tt = M0 + M1X + M2X^2$ donde X es el MW de la proteína de fusión, y $M0 = 116,21$; $M1 = -1,7499$; $M2 = 0,010349$.

El ELP en algunas realizaciones se selecciona o diseña para proporcionar una Tt que varía desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 37 °C en condiciones de formulación, tales como desde aproximadamente 20 hasta aproximadamente 37 °C, o desde aproximadamente 25 hasta aproximadamente 37 °C. En algunas realizaciones, la temperatura de transición en condiciones fisiológicas (por ejemplo, 0,9 % de solución salina) es desde aproximadamente 34 hasta 36 °C, para tener en cuenta una temperatura periférica ligeramente más baja.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal es la serie ELP-1 que incluye [VPGXG]_m, donde m es cualquier número desde 1 hasta 200, cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A puede ser aproximadamente 5:3:2. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₉₀, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A puede ser aproximadamente 5:3:2. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₁₂₀, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A puede ser aproximadamente 5:3:2.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₁₄₄, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 7:2:0. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₁₄₄, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 7:0:2. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₁₄₄, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 6:0:3. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye [VPGXG]₁₄₄, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 5:2:2.

En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye $[XPGVG]_m$, donde m es cualquier número desde 1 hasta 200, cada X se selecciona de V, G y A. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye $[XPGVG]_{144}$, donde m es cualquier número desde 1 hasta 200, cada X se selecciona de V, G y A y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 5:0:4. En ciertas realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz unida a hidrógeno a temperatura corporal incluye $[XPGVG]_{144}$, donde cada X se selecciona de V, G y A, y en donde la relación de V:G:A es aproximadamente 5:0:4.

Alternativamente, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz a temperatura corporal es la serie ELP-4 que incluye $[VPGVG]_{90}$, o $[VPGVG]_{120}$. 120 unidades estructurales de este ELP pueden proporcionar una temperatura de transición a aproximadamente 37 °C con aproximadamente 0,005 a aproximadamente 0,05 mg/mL (por ejemplo, aproximadamente 0,01 mg/mL) de proteína. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz a temperatura corporal incluye $[VPGXG]_{144}$ o $[XPGVG]_{144}$. Por ejemplo, 144 unidades estructurales de cualquiera de estos ELP pueden proporcionar una temperatura de transición entre aproximadamente 28 °C y 35 °C.

Se pueden preparar polímeros de la proteína péptido de tipo elastina (ELP) y proteínas de fusión recombinantes como se describen en la publicación de patente de EE. UU. N° 2010/0022455. En algunas realizaciones, los polímeros de la proteína ELP se construyen mediante ligación repetitiva para clonar rápidamente con polipéptidos altamente repetitivos de cualquier secuencia y longitud especificada a lo largo de un gran intervalo de pesos moleculares. En un único ciclo, se ligan juntas dos mitades de un plásmido parental, cada uno de los cuales contiene una copia de un oligómero, dimerizando así el oligómero y reconstituyendo un plásmido funcional. Este proceso se lleva a cabo repetidamente para ensamblar un gen oligomérico con el número deseado de repeticiones. Por ejemplo, se inserta una subunidad estructural de ELP (por ejemplo, un pentapéptido o un 9-mero de pentapéptidos en un vector. El vector se digiere, y se inserta otra unidad estructural de ELP (por ejemplo, un pentapéptido o un 9-mero de pentapéptidos). Cada ronda de digestión posterior y ligación dobla el número de unidades estructurales de ELP contenidas en el vector resultante hasta que el polímero de ELP sea de la longitud deseada.

En otras realizaciones, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz a temperatura corporal incluye una espiral al azar o estructura extendida no globular. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos capaz de formar la matriz a temperatura corporal incluye una secuencia de aminoácidos desvelada en la publicación de patente de EE. UU. N° 2008/0286808, publicación de patente WIPO N° 2008/155134 y la publicación de patente de EE. UU. N° 2011/0123487.

Por ejemplo, en algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos incluye un polímero recombinante no estructurado de al menos 40 aminoácidos. Por ejemplo, el polímero recombinante no estructurado se puede definir donde la suma de restos glicina (G), aspartato (D), alanina (A), serina (S), treonina (T), glutamato (E) y prolina (P) contenidos en el polímero no estructurado constituye más de aproximadamente 80 % de los aminoácidos totales. En algunas realizaciones, al menos 50 % de los aminoácidos carecen de estructura secundaria como se ha determinado por el algoritmo de Chou-Fasman. El polímero no estructurado incluye más de aproximadamente 100, 150, 200 o más aminoácidos contiguos. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos forma un dominio de espiral al azar. En particular, un polipéptido o polímero de aminoácidos que tiene o que forma "conformación de espiral al azar" carece sustancialmente de una estructura secundaria y terciaria definida.

En diversas realizaciones, el sujeto previsto es humano, y la temperatura corporal es aproximadamente 37 °C, y así el agente terapéutico se diseña para proporcionar una liberación sostenida o cerca de esta temperatura (por ejemplo, entre aproximadamente 28 °C y aproximadamente 37 °C). Una liberación lenta en la circulación con inversión del enlace de hidrógeno y/o interacciones hidrófobas se impulsa por una disminución en la concentración a medida que el producto difunde en el sitio de inyección, aún cuando la temperatura corporal siga siendo constante.

En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero no humano, y el agente terapéutico se diseña para presentar una liberación sostenida a la temperatura corporal del mamífero, que puede ser desde aproximadamente 30 hasta aproximadamente 40 °C en algunas realizaciones, tales como para ciertas mascotas domesticadas (por ejemplo, perro o gato) o ganado (por ejemplo, vaca, caballo, oveja o cerdo). En general, la Tt es superior a las condiciones de almacenamiento de la formulación (que pueden ser desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 30 °C, o aproximadamente 10 hasta aproximadamente 25 °C, o desde aproximadamente 15 hasta aproximadamente 22 °C, o desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 8 °C), de forma que el agente terapéutico siga en disolución para inyección. Alternativamente, el agente terapéutico se puede almacenar congelado, tal como desde aproximadamente -80 °C hasta aproximadamente -20 °C.

Trastornos asociados a la disfunción de la proteína CFTR y métodos de tratamiento

La disfunción de la proteína CFTR ocurre en diversas enfermedades o trastornos, que incluyen, pero no se limitan a, fibrosis quística, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos de los órganos exocrinos, bronquiectasia no asociada a fibrosis quística, pancreatitis recurrente, ausencia bilateral congénita del conducto deferente y trastornos asociados a un defecto adquirido en la función de la proteína CFTR (por ejemplo, provocado por fumar u otros factores ambientales). En una realización a modo de ejemplo, la disfunción de CFTR está asociada

con fibrosis quística. En otra realización a modo de ejemplo, la disfunción de CFTR está asociada con daño pulmonar relacionado con fumar.

Como se usa en el presente documento, el término "disfunción de la proteína CFTR" se refiere a cualquier disminución en la función de la proteína CFTR en comparación con un sujeto sano. La proteína CFTR puede presentar una pérdida de función total, o puede presentar cierta función residual o parcial en comparación con la función de CFTR en un sujeto sano. En algunas realizaciones, la función de CFTR disminuye en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la función de la proteína CFTR en un sujeto sano.

En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por una pérdida del transporte de ion cloruro a través de la membrana celular. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por una disminución en el transporte de agua a través de la membrana celular. En algunas realizaciones, la proteína CFTR está erróneamente restringida en la célula. En algunas realizaciones, la proteína CFTR no está restringida a la membrana apical de la célula.

Los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR varían entre pacientes individuales, pero en general, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por la producción de moco espeso que, por ejemplo, obstruye las vías respiratorias, obstruye los intestinos, bloquea los conductos pancreáticos y biliares, interfiere con la función hepática y daña el tejido. El daño tisular observado en sujetos con disfunción de la proteína CFTR puede afectar una variedad de tejidos y órganos que incluyen, pero no se limitan a, los pulmones, el páncreas, el hígado, los intestinos, el aparato reproductor, el aparato respiratorio y/o el aparato digestivo.

En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por un aumento de la salinidad en el sudor u otros líquidos corporales. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por un defecto en la eliminación de bicarbonato en el intestino. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por un aumento de la incidencia de infecciones, que incluyen, pero no se limitan a, infecciones de las vías respiratorias. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por un fenotipo de pulmón inflamatorio. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por una alteración de la actividad respiratoria. En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se caracteriza por problemas digestivos crónicos. En algunas realizaciones, la fibrosis quística se caracteriza por infertilidad masculina. Un paciente no presentará necesariamente todos estos síntomas, algunos de los cuales podrían estar ausentes en casos leves de disfunción de la proteína CFTR, o antes durante la progresión de la enfermedad.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona un método de tratamiento, retraso o mejora de los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR que comprende administrar composiciones farmacéuticas de un péptido intestinal vasoactivo y uno o más ELP a un sujeto que lo necesite.

La fibrosis quística causada por una cualquiera o más mutaciones en el gen CFTR se puede tratar, retrasar o mejorar por las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento. En algunas realizaciones, el sujeto es homocigótico para una o más mutaciones en el gen CFTR. En algunas realizaciones, el sujeto es heterocigótico para una o más mutaciones en el gen CFTR. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones son mutaciones terminadoras. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones son mutaciones de apertura. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones son mutaciones del procesamiento de proteínas. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones son mutaciones de conductancia. En algunas realizaciones, la una o más mutaciones son mutaciones de traducción. Los ejemplos de mutaciones de CFTR incluyen, pero no se limitan a, F508del, G542X, G85E, R334W, Y122X, G551D, R117H, A455E, S549R, R553X, V520F, R1162X, R347H, N1203K, S549N, R347P, R560T, S1255X, Add9T, Y1092X, M1191K, W1282X, 3659de;C, 394delTT, 3905insT, 1078delT, delta I507, 3876delA, 2184delA, 2307insA, 711+1G>T, 1717-1G>A, 2789+5G>A, 1898+5G>T, 3120+1G>A, 621+1G>T, 3849+10kbC>T, 1898+1G>A, 2183 AA>G y/o 5/7/9T. En una realización preferida, la mutación es F508del.

En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR se adquiere (por ejemplo, al fumar o por exposición a daño medioambiental). En algunas realizaciones, la disfunción de la proteína CFTR no está asociada a una mutación en el gen CFTR.

El tratamiento, retraso o mejora de los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR se pueden medir mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, las pruebas usadas para evaluar pacientes con disfunción de la proteína CFTR incluyen, pero no se limitan a, una prueba de cloruro en el sudor, una prueba del tripsinógeno inmunorreactivo (IRT), un análisis de sangre (por ejemplo, para probar la función pancreática), radiografía del tórax, pruebas de la función pulmonar, una prueba de la diferencia de potencial nasal, ensayos de la función de la proteína CFTR (por ejemplo, probando la salida de iones en las células), prueba de medición de la corriente celular, volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) y/o inmunofluorescencia para detectar la localización de la proteína CFTR en la célula.

Los efectos de la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden medir en cualquier tejido y/u órgano relevante, que incluye, pero no se limita a, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales nasales), pulmones, páncreas, el aparato digestivo, el aparato reproductor y/o el aparato respiratorio.

5 En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento previene, retrasa o mejora uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR en un sujeto. En algunas realizaciones, uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR se previenen, retrasan o mejoran durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con el uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR en un sujeto sin tratar con disfunción de CFTR. En algunas realizaciones, uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR se previenen, retrasan o mejoran en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con el uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR en un sujeto sin tratar con disfunción de CFTR. En algunas realizaciones, esta prevención, retraso o mejora de uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR se observa en los momentos desvelados en el presente documento.

20 En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento disminuye los niveles de cloruro en el sudor en un sujeto en comparación con un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, los niveles de cloruro en el sudor disminuyen durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la viscosidad del moco de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, los niveles de cloruro en el sudor disminuyen en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la viscosidad del moco de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, esta disminución en los niveles de cloruro en el sudor se observa en los momentos desvelados en el presente documento.

35 En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento mejora la viscosidad del moco en un sujeto en comparación con un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la viscosidad del moco mejora durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años, y/o aproximadamente 10 años en comparación con la viscosidad del moco de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la viscosidad del moco mejora en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la viscosidad del moco de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, esta mejora en la viscosidad del moco se observa en los momentos desvelados en el presente documento.

45 En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento previene, retrasa o mejora el desarrollo de fibrosis en un sujeto. En algunas realizaciones, el desarrollo de fibrosis se previene, retrasa o mejora durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con el desarrollo de fibrosis en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el desarrollo de fibrosis se previene, retrasa o mejora en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con el desarrollo de fibrosis en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, esta prevención, retraso o mejora de la fibrosis se observa en los momentos desvelados en el presente documento.

60 En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento previene, retrasa o mejora el daño tisular en uno o más órganos y/o tejidos en un sujeto. En algunas realizaciones, el daño tisular es causado por inflamación. En realizaciones preferidas, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento previene, retrasa o mejora el daño tisular en el tubo digestivo. En algunas realizaciones, la prevención, el retraso o la mejora del daño tisular en el tubo digestivo

alivian los problemas digestivos en el sujeto. En realizaciones preferidas, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento previene, retrasa o mejora el daño tisular en los pulmones en un sujeto. En algunas realizaciones, el daño tisular se previene, retrasa o mejora durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años o aproximadamente 10 años en comparación con el daño tisular en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el daño tisular se previene, retrasa o mejora en aproximadamente 1 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con el daño tisular en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, esta prevención, retraso o mejora del daño tisular se observa en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento mejora la función respiratoria en un sujeto. En algunas realizaciones, la mejora en la función respiratoria se determina midiendo el volumen espiratorio forzado en 1 segundo (FEV1) usando métodos bien conocidos en la técnica. En algunas realizaciones, la función respiratoria mejora en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % de la función respiratoria de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento mejora la función respiratoria en un sujeto durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la función respiratoria de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la función respiratoria mejora en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento mejora el transporte de agua a través de las membranas celulares en un sujeto. En algunas realizaciones, el transporte de agua mejora en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % de la velocidad del transporte de agua de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento mejora el transporte de agua a través de las membranas celulares en un sujeto durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la velocidad del transporte de agua de un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la velocidad del transporte de agua a través de membranas celulares mejora en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR en un sujeto. En algunas realizaciones, la función de la proteína CFTR es el transporte de iones cloruro a través de la membrana celular. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la función de la proteína CFTR en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR en un sujeto durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la función de la proteína CFTR en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el grado de elevación de la función de la proteína CFTR se observa en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR más que otros tratamientos para la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la función de la proteína CFTR es el transporte de iones cloruro a través de la membrana celular. En algunas realizaciones, los otros tratamientos para la disfunción de la proteína CFTR son correctores de CFTR, potenciadores de CFTR y/o supresores de mutaciones terminadoras (por ejemplo, ataluren). En algunas realizaciones, el otro tratamiento para la fibrosis quística es un tratamiento de combinación. En algunas realizaciones, el tratamiento de combinación es una combinación de un corrector de CFTR y un potenciador de

CFTR. En algunas realizaciones, los otros tratamientos para la disfunción de la proteína CFTR son VX770, VX809 o VX661. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la función de la proteína CFTR en un sujeto con disfunción de la proteína CFTR tratado con el otro tratamiento para la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la función de la proteína CFTR en un sujeto durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la función de la proteína CFTR en un sujeto con disfunción de la proteína CFTR tratado con el otro tratamiento para la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el grado de elevación de la función de la proteína CFTR se observa en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en un sujeto como se mide por inmunotransferencia. En algunas realizaciones, la proteína CFTR no se reutiliza tan rápidamente como en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en un sujeto durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la densidad de la proteína CFTR en la membrana celular apical en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el grado de elevación de la localización de la proteína CFTR en la membrana celular se observa en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento corrige la maduración de la proteína CFTR y la expresión de membrana en un sujeto. En algunas realizaciones, esta corrección de la maduración de la proteína CFTR y la expresión de membrana se mide por inmunotransferencia o inmunotinción con moléculas que se unen a CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la inmunotransferencia de CFTR o la señal de inmunotinción en aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 % o aproximadamente 99 % en comparación con la inmunotransferencia de CFTR o señal de inmunotinción en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, la administración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento aumenta la inmunotransferencia de CFTR o señal de inmunotinción durante aproximadamente 1 semana, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 1 año, aproximadamente 2 años, aproximadamente 5 años y/o aproximadamente 10 años en comparación con la inmunotransferencia de CFTR o señal de inmunotinción en un sujeto sin tratar con disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el grado de elevación de la inmunotransferencia de CFTR o señal de inmunotinción se observa en el sujeto en los momentos desvelados en el presente documento.

Composiciones farmacéuticas y administración

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas que incluyen un péptido intestinal vasoactivo y uno o más ELP con uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, dichos excipientes incluyen sales, y otros excipientes que pueden actuar para estabilizar el enlace de hidrógeno. Las sales a modo de ejemplo incluyen sales de metales alcalinotérreos tales como sodio, potasio y calcio. Los contraiones incluyen cloruro y fosfato. Las sales a modo de ejemplo incluyen cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio y fosfato de potasio.

La concentración de proteína en la formulación se adapta para estimular la formación de la matriz a la temperatura de administración. Por ejemplo, concentraciones más altas de proteína ayudan a estimular la formación de la matriz, y la concentración de proteína necesaria para este fin varía dependiendo de la serie de ELP usada. Por ejemplo, en realizaciones que usan ELP1-120, o secuencias de aminoácidos con temperaturas de transición comparables, la proteína está presente en el intervalo de aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, o está

presente en el intervalo de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 125 mg/mL. La porción de péptido intestinal vasoactivo de la proteína de fusión en la composición terapéutica puede estar presente en el intervalo de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, o aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 30 mg/mL, o aproximadamente 10-20 mg/mL, o aproximadamente 5-15 mg/mL, o aproximadamente 1-10 mg/mL. En realizaciones que usan ELP4-120, o secuencias de aminoácidos con temperaturas de transición comparables, la proteína está presente en el intervalo de aproximadamente 0,005 mg/mL a aproximadamente 10 mg/mL, o está presente en el intervalo de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 5 mg/mL. En algunas realizaciones, el péptido intestinal vasoactivo está presente en el intervalo de aproximadamente 0,5 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL, o está presente en el intervalo de aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 125 mg/mL. En algunas realizaciones, el péptido intestinal vasoactivo está presente en el intervalo de aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL, o el intervalo de aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 30 mg/mL.

La composición farmacéutica se prepara, en general, de manera que no se forme la matriz en las condiciones de almacenamiento. Las condiciones de almacenamiento son, en general, inferiores a la temperatura de transición de la formulación, tales como inferior a aproximadamente 32 °C, o inferior a aproximadamente 30 °C, o inferior a aproximadamente 27 °C, o inferior a aproximadamente 25 °C, o inferior a aproximadamente 20 °C, o inferior a aproximadamente 15 °C, o inferior a aproximadamente 10 °C. La condición de almacenamiento puede estar, alternativamente, por debajo de la congelación, tal como inferior a aproximadamente -10 °C, o inferior a aproximadamente -20 °C, o inferior a aproximadamente -40 °C, o inferior a aproximadamente -70 °C. Por ejemplo, la formulación puede ser isotónica con la sangre o tener una fuerza iónica que imita las condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la formulación puede tener una fuerza iónica de al menos la de cloruro sódico 25 mM, o al menos la de cloruro sódico 30 mM, o al menos la de cloruro sódico 40 mM, o al menos la de cloruro sódico 50 mM, o al menos la de cloruro sódico 75 mM, o al menos la de cloruro sódico 100 mM, o al menos la de cloruro sódico 150 mM. En ciertas realizaciones, la formulación tiene una fuerza iónica inferior a la de 0,9 % de solución salina. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica incluye dos o más de cloruro de calcio, cloruro de magnesio, cloruro de potasio, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, dihidrogenofosfato de sodio y hidrogenofosfato de disodio. La composición farmacéutica líquida se puede almacenar congelada, refrigerada o a temperatura ambiente.

En realizaciones a modo de ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica de liberación sostenida que incluye un péptido intestinal vasoactivo o derivados del mismo (por ejemplo, que tiene un resto de extremo N tal como una metionina) y una o más secuencias de aminoácidos que incluyen [VPGXG]₉₀, o [VPGXG]₁₂₀, donde cada X se selecciona de V, G y A. V, G y A pueden estar presentes en una relación de aproximadamente 5:3:2, de aproximadamente 7:2:0, de aproximadamente 7:0:2, de aproximadamente 6:0:3, o de aproximadamente 5:2:2. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos incluye [VPGVG]₉₀ o [VPGVG]₁₂₀. En realizaciones a modo de ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica de liberación sostenida que incluye un péptido intestinal vasoactivo o derivados del mismo (por ejemplo, que tiene un resto de extremo N tal como una metionina) y una o más secuencias de aminoácidos que incluyen [XPGVG]₁₄₄, donde cada X se selecciona de V, G y A. V, G y A pueden estar presentes en una relación de aproximadamente 5:0:4. Alternativamente, la secuencia de aminoácidos incluye [XPGVG]₁₄₄. La formulación adicional incluye uno o más excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables para la formación de una matriz reversible a partir de una forma acuosa tras la administración a un sujeto humano. El VIP y los derivados del mismo se desvelan en la publicación de patente de EE. UU. N° 2011/0178017.

También se pueden emplear otros componentes de formulación para lograr, por ejemplo, la estabilidad deseada. Dichos componentes incluyen uno o más aminoácidos o alcohol de azúcar (por ejemplo, manitol), tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80), conservantes y agentes de tamponamiento (por ejemplo, histidina), y dichos componentes se conocen bien en la técnica. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento tienen eficacia potenciada, biodisponibilidad, semivida terapéutica, persistencia, ayuda de degradación, etc.

Ventajosamente, las composiciones proporcionan exposición farmacocinética prolongada debido a la liberación sostenida del agente activo. En aspectos particulares, el nivel máximo de exposición se puede lograr en aproximadamente 10 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas o aproximadamente 72 horas después de la administración; normalmente la máxima tasa de exposición se logra entre aproximadamente 10 horas y aproximadamente 48 horas después de la administración. Después de lograr la máxima tasa de exposición, las composiciones pueden lograr una tasa sostenida de la liberación por la cual se obtiene un porcentaje sustancial de la máxima tasa durante un periodo de tiempo. Por ejemplo, la tasa sostenida puede ser aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 %. Los periodos de tiempo a modo de ejemplo para mantener la tasa sostenida son aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas o aproximadamente 8 semanas, después de que se logre la máxima tasa de exposición. Posteriormente, la tasa sostenida se puede reducir hasta una tasa de exposición reducida. Dichas tasas de exposición reducida pueden ser aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, aproximadamente 20 %, aproximadamente 30 %, aproximadamente 40 %, aproximadamente 50 % o aproximadamente 60 %.

En diversas realizaciones, la concentración plasmática del agente activo no cambia en más de un factor de 10, o un factor de aproximadamente 5, o un factor de aproximadamente 3 durante el transcurso de una pluralidad de administraciones, tales como al menos 2, al menos aproximadamente 5, o al menos aproximadamente 10 administraciones de la formulación. Las administraciones están sustancialmente uniformemente separadas, tal como, por ejemplo, aproximadamente diariamente, o aproximadamente una vez a la semana, o de una a aproximadamente cinco veces al mes, o aproximadamente una vez cada dos meses, o aproximadamente una vez cada tres meses.

En otro aspecto, la divulgación proporciona un método de administración de una pauta de liberación sostenida de un péptido intestinal vasoactivo o análogos del mismo. El método comprende administrar la composición farmacéutica descrita en el presente documento a un sujeto en necesidad, en donde la composición farmacéutica se administra desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 8 veces al mes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra aproximadamente 1 vez, aproximadamente 2 veces, aproximadamente 3 veces y/o aproximadamente 4 veces al mes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra semanalmente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra diariamente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra desde una hasta tres veces a la semana. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra una vez cada dos semanas. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra desde una hasta dos veces al mes. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se administra aproximadamente 1 vez al mes. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra aproximadamente una vez cada 2 meses, aproximadamente una vez cada 3 meses, aproximadamente una vez cada 4 meses, aproximadamente una vez cada 5 meses y/o aproximadamente una vez cada 6 meses. En algunas realizaciones, el VIP puede tener un resto adicional, tal como metionina en el extremo N para alterar el nivel de unión al receptor, como se describe en la publicación de patente de EE. UU. N° 2011/0178017. En algunas realizaciones, el VIP se fusiona con ELP1 (que tiene desde aproximadamente 90 hasta aproximadamente 150 unidades de ELP). En algunas realizaciones, el VIP se fusiona con ELP4 (que tiene desde aproximadamente 90 hasta aproximadamente 150 unidades de ELP). La composición farmacéutica se puede envasar en forma de plumas o jeringas precargadas para administración una vez por semana, dos veces por semana, o desde una hasta ocho veces por mes, o alternativamente se envasan en viales convencionales y similares.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran crónicamente. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran durante aproximadamente 6 meses, durante aproximadamente 7 meses, durante aproximadamente 8 meses, durante aproximadamente 9 meses, durante aproximadamente 10 meses, durante aproximadamente 11 meses, durante aproximadamente 1 año, durante aproximadamente 2 años, durante aproximadamente 3 años, durante aproximadamente 4 años, durante aproximadamente 5 años, durante aproximadamente 10 años o más. Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar en cualquier dosis y/o frecuencia requerida desvelada en el presente documento.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran hasta que mejoran los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran hasta que mejoran, se retrasan y/o curan los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran antes de que el paciente empiece a presentar uno o más síntomas de la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran inmediatamente o poco después del diagnóstico. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran en el momento de aparición de los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se administran en el momento de aparición de una exacerbación de los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR.

El agente terapéutico es, en general, para "administración sistémica", que significa que el agente no se administra localmente a un sitio patológico o un sitio de acción. En su lugar, el agente se absorbe en la circulación sanguínea desde el sitio de inyección, donde el agente actúa por vía sistémica o se transporta hasta un sitio de acción por la circulación. El agente terapéutico se puede administrar por cualquier vía conocida, tal como, por ejemplo, por vía oral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía intravaginal y por vía intrarrectal. En una realización, la formulación es, en general, para administración subcutánea. En una realización, los parámetros farmacocinéticos (FC) se prolongan cuando el agente se administra por vía subcutánea. En una realización, se prolonga la semivida de la proteína de fusión. En una realización, se prolongan los parámetros FC cuando el agente se administra por vía subcutánea en comparación con el agente administrado por otros medios (por ejemplo, por vía intravenosa). En una realización, el depósito del agente se prolonga cuando el agente se administra por vía subcutánea en comparación con el agente administrado por otros medios (por ejemplo, por vía intravenosa).

En algunas realizaciones, la formulación se administra aproximadamente mensualmente, y se puede administrar por vía subcutánea o por vía intramuscular. En algunas realizaciones, la formulación se administra aproximadamente semanalmente, y se puede administrar por vía subcutánea o por vía intramuscular. En algunas realizaciones, el sitio de administración no es un sitio patológico, por ejemplo, no es el sitio de acción previsto.

5 Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden administrar en dosis más pequeñas y/o menos frecuentemente que los homólogos no fusionados o no conjugados. Aunque un experto en la técnica puede determinar las dosis deseables en cada caso, una dosis adecuada del agente terapéutico para el logro del beneficio terapéutico puede estar, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 1 microgramo (μg) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por kilogramo de peso corporal de receptor por día, preferentemente en un intervalo de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal por día y lo más preferentemente en un intervalo de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal por día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a una baja dosis. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a una dosis entre 1 mg por kilogramo por peso corporal por día a aproximadamente 9 mg por kilogramo por peso corporal por día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra a aproximadamente 1 mg por kilogramo de peso corporal por día, aproximadamente 3 mg por kilogramo de peso corporal por día y/o aproximadamente 9 mg por kilogramo de peso corporal por día. La dosis deseada se puede presentar como una dosis o dos o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del día. Estas subdosis se pueden administrar en formas farmacéuticas unitarias, por ejemplo, que contienen desde aproximadamente 10 μg a aproximadamente 1000 mg, preferentemente desde aproximadamente 50 μg a aproximadamente 500 mg, y lo más preferentemente desde aproximadamente 50 μg hasta aproximadamente 250 mg de principio activo para la forma farmacéutica unitaria. Alternativamente, si la condición del receptor así lo requiere, las dosis se pueden administrar como una infusión continua.

En ciertas realizaciones, el sujeto es un humano, pero en otras realizaciones puede ser un mamífero no humano, tal como una mascota domesticada (por ejemplo, perro o gato), o ganado o animal de granja (por ejemplo, caballo, vaca, oveja o cerdo).

Terapias de combinación

Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden administrar con diversas terapias usadas para tratar, prevenir, retrasar o mejorar los síntomas de la disfunción de la proteína CFTR, que incluyen, pero no se limitan a, terapia física, oxigenoterapia, terapia respiratoria, terapia génica, drenaje bronquial o postural y/o agentes terapéuticos. Las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se pueden usar solas o en combinación con uno o más agentes terapéuticos. El uno o más agentes terapéuticos pueden ser cualquier compuesto, molécula o sustancia que ejerza un efecto terapéutico en un sujeto en necesidad del mismo.

El uno o más agentes terapéuticos se pueden "coadministrar", es decir, administrar juntos en un modo coordinado a un sujeto, ya sea como composiciones farmacéuticas separadas o mezclados en una única composición farmacéutica. Por "coadministrado", el uno o más agentes terapéuticos también se pueden administrar simultáneamente con las presentes composiciones farmacéuticas, o se pueden administrar por separado, que incluye en momentos diferentes y con frecuencias diferentes. El uno o más agentes terapéuticos se pueden administrar por cualquier vía conocida, tal como por vía oral, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía nasal, por vía subcutánea, por vía intravaginal, por vía intrarrectal y similares; y el agente terapéutico también se puede administrar por cualquier vía convencional. En muchas realizaciones, al menos un agente terapéutico se puede administrar por vía subcutánea.

Este uno o más agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antibióticos, mucolíticos, potenciadores de CFTR (por ejemplo, flavonas, xantinas, bencimidazoles, ivacaftor (VX-770), QBW251, PG-01, VR-532), correctores de CFTR (por ejemplo, lumacaftor (VX-809) VX-661, curcumina, miglustat, sildenafil, 4-fenil-butirato, corr-4a, glafanina, RDR1), agentes de ultralectura de mutaciones terminadoras (por ejemplo, ataluren), correctores de la producción de CFTR, agentes de ultralectura, agentes de canales de iones de molécula pequeña, agentes osmóticos, reparación de ARN, estimulantes de la guanilato ciclase soluble, inhibidores de la S-nitrosoglutatión reductasa, DNasa, antifúngicos, broncodilatadores, óxido nítrico, anticolinérgicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), estabilizadores de la membrana, corticosteroides, enzimoterapia reitutiva, corticosteroides, glucocorticosteroides, descongestivos y/o antifibróticos (por ejemplo, halofuginona). En algunas realizaciones, se coadministran un potenciador de CFTR y un corrector de CFTR. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se coadministran con uno o más potenciadores de CFTR y/o correctores de CFTR. En realizaciones preferidas, las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento se coadministran con VX770, VX809 y/o VX661.

En algunas realizaciones, la coadministración de las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento con uno o más agentes terapéuticos tiene un efecto sinérgico. En algunas realizaciones, el efecto sinérgico es sobre la función de la proteína CFTR. En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos son correctores de CFTR. En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos son potenciadores de CFTR. En algunas realizaciones, el uno o más agentes terapéuticos son VX770, VX809 y/o VX661.

5 Cuando dos o más agentes terapéuticos se usan en combinación, la dosis de cada agente terapéutico es comúnmente idéntica a la dosis del agente cuando se usa independientemente. Sin embargo, cuando un agente terapéutico interfiere con el metabolismo de los otros, se ajusta apropiadamente la dosis de cada agente terapéutico. Alternativamente, donde los dos o más agentes terapéuticos muestran efectos sinérgicos, se puede reducir la dosis de uno o más. Cada agente terapéutico se puede administrar simultáneamente o por separado en un intervalo de tiempo apropiado.

10 Se debe entender que las formas en singular tales como "un", "una", "el" y "la" se usan en toda la presente solicitud por comodidad, sin embargo, excepto donde el contexto o una declaración explícita indique de otro modo, las formas en singular pretenden incluir el plural. Se debe entender que todos los intervalos numéricos incluyen todos y cada uno de los puntos numéricos dentro del intervalo numérico, y se deben interpretar como que citan todos y cada uno de los puntos numéricos individualmente. Los puntos extremos de todos los intervalos referidos al mismo componente o propiedad son incluyentes, y pretenden ser independientemente combinables.

15 El término "aproximadamente", cuando se usa a propósito de una indicación numérica referenciada, significa la indicación numérica referenciada más o menos hasta 10 % de esa indicación numérica referenciada. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 50" cubre el intervalo de 45 a 55.

20 Como se usa en el presente documento, la palabra "incluir", y sus variantes, pretende ser no limitante, de forma que la citación de los puntos en una lista no es para la exclusión de otros puntos similares que también pueden ser útiles en los materiales, composiciones, dispositivos y métodos de esta tecnología. Similarmente, el término "poder" y sus variantes pretenden ser no limitantes, de forma que la citación de que una realización puede comprender ciertos elementos o características no excluye otras realizaciones de la presente tecnología que no contienen los elementos o características. Aunque el término de extremos abiertos "que comprende," como sinónimo de términos tales como que incluye, que contiene o que tiene, se usa en el presente documento para describir y reivindicar la divulgación, la presente tecnología, o realizaciones de la misma, se puede describir alternativamente usando términos más limitantes tales como "que consiste en" o "que consiste esencialmente en" los componentes citados.

25 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se pueden usar cualesquiera métodos y materiales, similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, en la práctica o ensayo de la presente divulgación, los métodos y materiales preferidos se describen en el presente documento.

30 La presente divulgación se ilustra adicionalmente por los siguientes ejemplos no limitantes.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: La administración de PB1046 o PB1120 rescata la función de F508del-CFTR

35 Se puede rescatar F508del-CFTR altamente funcional en células epiteliales de fibrosis quística corrigiendo su plegamiento erróneo para promover el direccionamiento de membrana mientras se aumenta la estabilidad superficial. Aunque se ha mostrado que VIP rescata esta mutación en células de fibrosis quística, la breve semivida de esta proteína en suero (≤ 1 minuto) limita su uso terapéutico. En el presente documento se desvelan terapéuticos de VIP estables de larga duración, PB1120 y PB1046, que incluyen secuencias de ELP. Estos datos demuestran que PB1120 y PB1046 rescatan F508del-CFTR.

40 Se usó una línea celular epitelial nasal humana JME/CF15, derivada de un paciente con fibrosis quística homocigótico para la mutación F508del (Jefferson (1990)) para evaluar el efecto de los compuestos de VIP sobre la función de la proteína CFTR. Se cultivaron células a 37 °C con un 5 % de CO₂ - 95 % de humedad en DMEM-F12 con 10 % de FBS y complementado con transferrina (5 µg/mL), triyodotironina (2 nM), insulina (5 µg/mL), hidrocortisona (1,1 µM), EGF (1,64 nM), epinefrina (5,5 µM) y adenina (18 µM). Las células se mantuvieron a 37 °C y se incubaron con VIP 900 nM, PB1046 1,2 µM (SEQ ID NO: 15) o PB1120 1 µM (SEQ ID NO: 20) durante 18 o 24 horas antes del ensayo para la salida de yoduro. Para la comparación, se incubaron células con los correctores de CFTR VX-809 (lumacaftor) o VX-661.

45 Para evaluar el efecto de los compuestos de prueba sobre la función de la proteína CFTR, se determinó la actividad del canal de cloruro de CFTR estudiando la salida de iones yoduro usando un electrodo sensible al yoduro. Se incubaron células con tampón de carga NaI (NaI 136 mM, KNO₃ 3 mM, Ca(NO₃) 2 mM, glucosa 11 mM, HEPES 20 mM, pH 7,4) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entonces se retiró la disolución extracelular de NaI y se sustituyó con tampón de salida en el que el NaI se sustituyó con NaNO₃. Se tomaron muestras y se sustituyeron a intervalos de 1 minuto. Se usaron las 3 primeras muestras tomadas antes de la adición de la mezcla de activación de CFTR (tiempo 0-2 min) para establecer un nivel basal estable de salida de iones. Se incluyó mezcla de activación de CFTR (cpt-AMPC 150 µM + IBMX 1mM + forskolina 10 µM) en el tampón de salida a partir del momento 3 minutos. 55 Entonces se midió la concentración de NaI usando un electrodo sensible al yoduro que se movió sobre cada muestra por un inyector automático informatizado y se calculó la constante de salida de NaI k (min⁻¹). Se compararon los picos de salida de yoduro (velocidad máxima de salida durante la estimulación - nivel basal).

Se midieron las velocidades de salida de yoduro en células JME/CF15 mantenidas a 37 °C y previamente incubadas con VIP, PB1046 o PB1120 a 30-3.500 nM durante 2 horas. La **Figura 2** muestra las velocidades de salida de yoduro para estos agentes, y la Tabla 1 muestra CE50 y las concentraciones estables (n = 3-5) para cada uno. Se estimuló F508del-CFTR rescatado por una mezcla de activadores de AMPc añadidos al tampón de salida. La **Figura 3** muestra la evolución temporal de los efectos del corrector de estos terapéuticos de VIP. La actividad fue significativamente reducida cuando el compuesto inhibidor de CFTR CFTR_{inh172} (20 μM) se incluyó en la incubación, confirmando que la salida de yoduro estaba mediada por CFTR.

Tabla 1

	VIP	PB1120 (n = 3-5)	PB1046 (n = 3-5)
CE ₅₀	65 nM	140 nM	355 nM
Concentración estable	900 nM	1000 nM	1200 nM

Se realizó inmunotransferencia para visualizar la localización de F508del-CFTR en las células epiteliales tratadas con VIP, PB1120 o PB1046. Como se muestra en la **Figura 4**, el tratamiento con PB1120 y PB1046 corrigió la maduración de F508del-CFTR y la expresión de membrana.

La incubación de células JME/CF15 a 27 °C, en vez de a 37 °C, permite el procesamiento de F508del-CFTR y su expresión en la membrana celular. Cuando las células se incuban a 37 °C esencialmente no se detecta la salida de yoduro por encima del fondo. La **Figura 5** muestra que VIP, PB1046 y PB1120 fueron todos capaces de corregir y/o potenciar la actividad de F508del-CFTR a un grado equivalente o mayor que VX-809 y VX-661.

Ejemplo 2: La coadministración de PB1120 o PB1046 con VX-770 o VX-809 tiene un efecto sinérgico sobre el rescate de la función de F508del-CFTR

Para estudiar los efectos de la administración de PB1120 o PB1046 junto con los potenciadores de CFTR o los correctores de CFTR, se realizaron ensayos de salida de yoduro como se describe en el Ejemplo 1.

Se trataron de forma aguda células JME/CF15 con 1 μM del potenciador de CFTR VX-770 (ivacaftor) y luego se trataron con PB1046 350 nM durante 18 horas o PB1120 140 nM durante 24 horas. Como se muestra en la **Figura 6A**, el tratamiento con VX-770 solo no mostró efecto sobre la salida de yoduro. Sin embargo, cuando PB1046 o PB1120 se administraron en combinación con VX-770 se observó un efecto sinérgico sobre la salida de yoduro (**Figuras 6B y C**). Esta sinergia también se observa cuando las células se tratan tanto con PB1120 1 μM como con VX-809 1 μM durante 24 horas (**Figura 7**).

Referencias de patente: US 2001/0034050; US 2009/0220455; US 8.334.257; US 2013/0310538; US 2013/0172274; US 2011/0236384; US 6.582.926; US 7.429.458; US 7.364.859; US 8.178.495; US 2013/0079277; US 2013/0085099; US 2013/0143802; US 2014/0024600; US 2011/0178017; US 7.709.227; US 2011/0123487; US 8.729.018; US 2014/0171370; US 2013/0150291; WO/2014/113434; US 2014/0213516; solicitud de EE. UU. N° 62/082.945 presentada el 21 de noviembre de 2014; solicitud de EE. UU. N° 62/113.943 presentada el 9 de febrero de 2015; y solicitud de EE. UU. N° 62/145.770 presentada el 10 de abril de 2015.

Referencias

Aliakbari et al. (1978) Selective localization of vasoactive intestinal peptide and substance P in human eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 148(3): 1440-1445.

Alshafie et al. (2014). *Am. J. Physiol-Cell Physiol.* 307(1):C107-109.

Chappe et al. (2008) VIP increases CFTR levels in the apical membrane of calu-3 cells through a PKC-dependent mechanism. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 327:226-38.

Chappe and Said (2012) VIP as a Corrector of CFTR Trafficking and membrane stability. In *Cystic Fibrosis - Renewed Hopes Through Research*. D. Sriramulu (Ed.).

Choi et al. (2007) Synergistic airway gland mucus secretion in response to vasoactive intestinal peptide and carbachol is lost in cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 117(10):3118-3127.

Cutz et al. (1978) Release of vasoactive intestinal polypeptide in mast cells by histamine liberators. *Nature.* 275:661-662.

Derand et al. (2004) Activation of VPAC1 receptors by VIP and PACAP-27 in human bronchial epithelial cells induces CFTR-dependent chloride secretion. *Br. J. Pharmacol.* 141:698-708.

- Heinz-Erian et al. (1985) Deficient vasoactive intestinal peptide innervation in the sweat glands of cystic fibrosis patients. *Science* 229:1407-8.
- Heinz-Erian et al. (1986) Receptors for vasoactive intestinal peptide on isolated human sweat glands. *Peptides* 7Suppl.1:151-154.
- 5 Jefferson et al. (1990) Expression of normal and cystic fibrosis phenotypes by continuous airway epithelial cell lines. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 259: L496-L505.
- Joo et al. (2002) Absent secretion to vasoactive intestinal peptide in cystic fibrosis airway glands. *JBC*. 277(52):50710-5.
- 10 Joo et al. (2010) Hyposecretion of fluid from tracheal submucosal glands of CFTR-deficient pigs. *The J. Clin. Invest.* 120(9):3161-3166.
- Li and Naren (2010) CFTR Chloride Channel in the Apical Compartments: Spatiotemporal Coupling to its Interacting Partners. *Integr Biol (Camb)* Apr 7; 2(4): 161-177.
- Lundberg et al. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: Functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *PNAS*. 77(3):1651-5.
- 15 Raju et al. (2013) Cigarette smoke induces systemic defects in Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Function. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 188:1321-1330.
- Riordan et al. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*. 245:1066-1073.
- 20 Rowe and Verkman (2013) Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator Correctors and Potentiators. *Cold Spring Harb Perspect Med*; 3a009761.
- Sloane et al. (2012) A pharmacologic approach to acquired Cystic Fibrosis transmembrane conductance regulator dysfunction in smoking related lung disease. *PLOS One*. 7:e39809.
- Quinton PM. (1983) Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 301:421-422.
- 25 Therapeutic Proteins: Strategies to Modulate Their Plasma Half-Life. Kontermann, R. (Ed.) Wiley-Blackwell Press. (2012) pp. 7-9
- Wine et al. (2007) Parasympathetic control of airway submucosal glands: Central reflexes and the airway intrinsic nervous system. *Autonomic Neuroscience: Basic & Clinical*. 133:35-54.
- Wu et al. (2011) Prospect of vasoactive intestinal peptide therapy for COPD/PAH and asthma: A review. *Respiratory Res.* 12:45-9921-12-45.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> PhaseBio Pharmaceuticals, Inc.

Arnold, Susan

Ballance, David James

<120> MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA TRATAR LA FIBROSIS QUÍSTICA

<130> PHAS-030/01WO 309646-

<140> Presentado con la presente

<141> 08-05-2015

<150> US 61/990.425

<151> 08-05-2014

<160> 20

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 1

Val Pro Gly Gly
1

<210> 2

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 818 824 T3

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 2

Ile Pro Gly Gly
1

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural o no natural

<400> 3

Val Pro Gly Xaa Gly
1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 4

Ala Val Gly Val Pro
1 5

ES 2 818 824 T3

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural o no natural

<400> 5

```
Ile Pro Gly Xaa Gly
1                               5
```

<210> 6

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 6

```
Ile Pro Gly Val Gly
1                               5
```

<210> 7

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

ES 2 818 824 T3

<220>

<221> característica_misc

<222> (4)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural o no natural

<400> 7

Leu Pro Gly Xaa Gly
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 8

Leu Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 9

Val Ala Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 10

<211> 8

ES 2 818 824 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 10

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 11

Val Pro Gly Phe Gly Val Gly Ala Gly
1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<400> 12

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
1 5

<210> 13

<211> 5

ES 2 818 824 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de componente de ELP

<220>

<221> característica_misc

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que existe de forma natural o no natural

<400> 13

Xaa Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M-VIP

<400> 14

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 15

<211> 634

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M-VIP ELP1-120

ES 2 818 824 T3

<400> 15

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
 1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly
 20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
 35 40 45

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 50 55 60

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 65 70 75 80

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 85 90 95

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 100 105 110

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
 115 120 125

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
 130 135 140

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 145 150 155 160

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 165 170 175

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 180 185 190

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 195 200 205

ES 2 818 824 T3

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 210 215 220

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 245 250 255

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 260 265 270

Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 275 280 285

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
 290 295 300

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 305 310 315 320

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 325 330 335

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
 340 345 350

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
 355 360 365

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly
 370 375 380

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
 385 390 395 400

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 405 410 415

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 420 425 430

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
 435 440 445

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly

ES 2 818 824 T3

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val
 20 25 30

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 35 40 45

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
 65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
 85 90 95

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 115 120 125

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 130 135 140

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 145 150 155 160

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 165 170 175

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 180 185 190

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 195 200 205

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 210 215 220

Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
 245 250 255

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 260 265 270

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro

ES 2 818 824 T3

	275		280		285										
Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly
	290				295					300					
Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly
	305				310					315					320
Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly
				325					330					335	
Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val
			340					345					350		
Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro
		355					360					365			
Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly
	370					375					380				
Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala
	385				390					395					400
Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly
				405					410					415	
Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val
			420					425					430		
Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro
		435					440					445			
Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly
	450					455				460					
Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Gly
	465				470					475					480
Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly
				485					490					495	
Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Val	Gly	Val
			500					505					510		
Pro	Gly	Val	Gly	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Val	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Pro
		515					520					525			

ES 2 818 824 T3

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 530 535 540

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 545 550 555 560

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 565 570 575

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 580 585 590

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 595 600 605

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 610 615 620

Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
 625 630 635

<210> 17

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 17

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25

<210> 18

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> M-VIP-ELP1

<400> 18

ES 2 818 824 T3

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
 1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly
 20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
 35 40 45

Gly Val
 50

<210> 19

<211> 50

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> MAA-VIP

<400> 19

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val
 20 25 30

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 35 40 45

Gly Ala
 50

<210> 20

<211> 633

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> VIP ELP1-120

<400> 20

ES 2 818 824 T3

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly Val
20 25 30

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
50 55 60

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
65 70 75 80

ES 2 818 824 T3

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
85 90 95

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
100 105 110

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
115 120 125

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
130 135 140

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
145 150 155 160

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
165 170 175

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
180 185 190

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
195 200 205

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
245 250 255

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
260 265 270

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
275 280 285

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
290 295 300

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
305 310 315 320

Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly

ES 2 818 824 T3

325 330 335

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
 340 345 350

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
 355 360 365

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 370 375 380

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 385 390 395 400

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 405 410 415

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val
 420 425 430

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 435 440 445

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 450 455 460

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 465 470 475 480

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 485 490 495

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 500 505 510

Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
 515 520 525

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 530 535 540

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 545 550 555 560

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
 565 570 575

ES 2 818 824 T3

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
580 585 590

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
595 600 605

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
610 615 620

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión que comprende un péptido intestinal vasoactivo (VIP) y uno o más péptidos de tipo elastina (ELP), que comprende unidades repetidas de cualquiera de SEQ ID Nos: 1-13 para su uso en el tratamiento de fibrosis quística o en el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado a una reducción de la función de la proteína CFTR.
2. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 1, en donde el ELP comprende 120 unidades repetidas de VPGXG (SEQ ID NO: 3), donde X se selecciona independientemente de Val, Ala y Gly, opcionalmente en donde X se selecciona independientemente de Val, Ala y Gly en una relación de aproximadamente 5:2:3.
- 10 3. La composición farmacéutica para su uso según las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido VIP tiene una preferencia de unión relativa por VPAC2 con respecto a VPAC1, o en donde el péptido VIP tiene una preferencia de unión relativamente equipotente por VPAC2 y VPAC1.
4. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición farmacéutica se formula para administración subcutánea, intramuscular o intravenosa, o para liberación sostenida.
- 15 5. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 4, en donde la composición farmacéutica se administra por vía subcutánea o por vía sistémica.
6. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición farmacéutica comprende SEQ ID NO: 15 o SEQ ID NO: 20.
- 20 7. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición farmacéutica se administra con una o más terapias adicionales contra la fibrosis quística o terapias para tratar trastornos asociados a la reducción de la función de la proteína CFTR.
8. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en donde la una o más terapias adicionales contra la fibrosis quística se seleccionan del grupo que consiste en potenciadores del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), correctores de CFTR, agentes de ultralectura de mutaciones terminadoras, correctores de la producción de CFTR, agentes de ultralectura, agentes de canales de iones de molécula pequeña, agentes osmóticos, terapia génica, reparación de ARN, estimulantes de la guanilato ciclasa soluble, inhibidores de la S-nitrosoglutatión reductasa, DNasa, antibióticos, antifúngicos, mucolíticos, broncodilatadores, óxido nítrico, anticolinérgicos, fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), estabilizadores de la membrana, corticosteroides y enzimoterapia restitutiva.
- 25 9. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en donde el potenciador de CFTR se selecciona del grupo que consiste en ivacaftor (VX-770) y QBW251, o en donde el corrector de CFTR se selecciona del grupo que consiste en lumacaftor (VX-809) y VX-661.
- 30 10. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente tiene una o más mutaciones en un gen CFTR, en donde el paciente es homocigótico o heterocigótico para la una o más mutaciones en el gen CFTR.
- 35 11. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 10, en donde el paciente tiene una mutación F508del.
12. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el paciente no tiene una mutación en el gen CFTR.
- 40 13. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en donde el paciente tiene enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC).
14. La composición farmacéutica para su uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la administración de la composición farmacéutica aumenta la función de la proteína CFTR en las células del paciente en comparación con la función de la proteína CFTR en un paciente no tratado.
- 45 15. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 14, en donde la administración de la composición farmacéutica aumenta las velocidades de salida de iones en las células del paciente en comparación con las velocidades de salida de iones en un paciente no tratado, aumenta la función respiratoria del paciente en comparación con la función respiratoria de un paciente no tratado, o disminuye la concentración de cloruro en el sudor en un paciente en comparación con la concentración de cloruro en el sudor de un paciente no tratado.
- 50

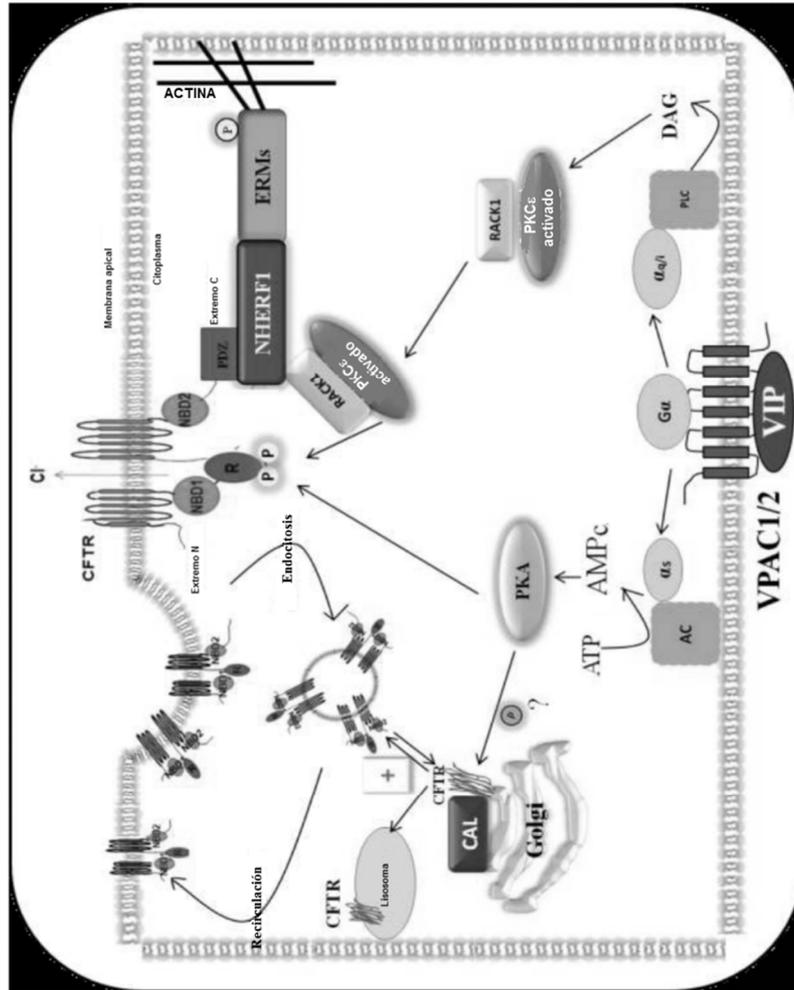


FIGURA 1

FIGURA 2

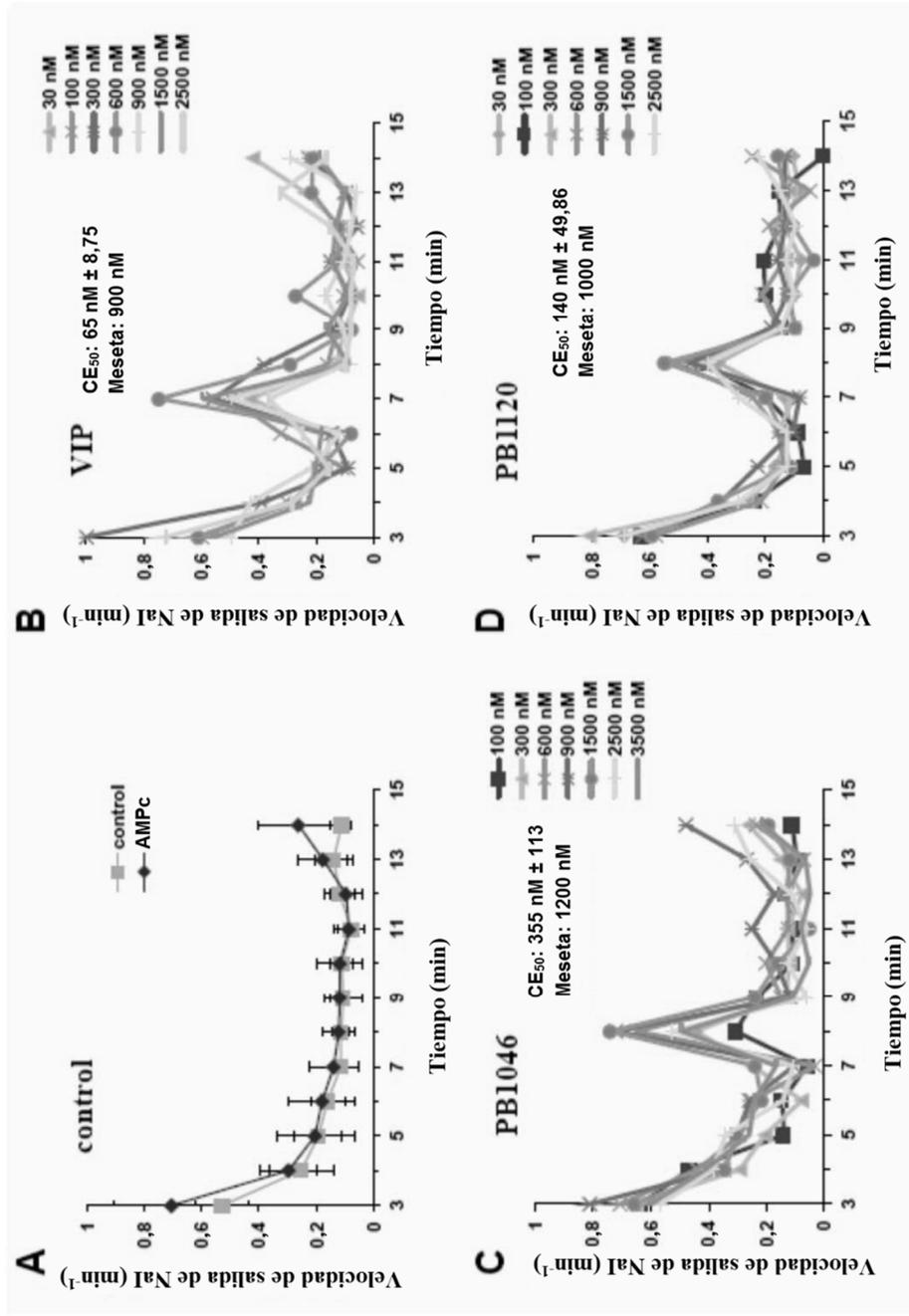


FIGURA 3

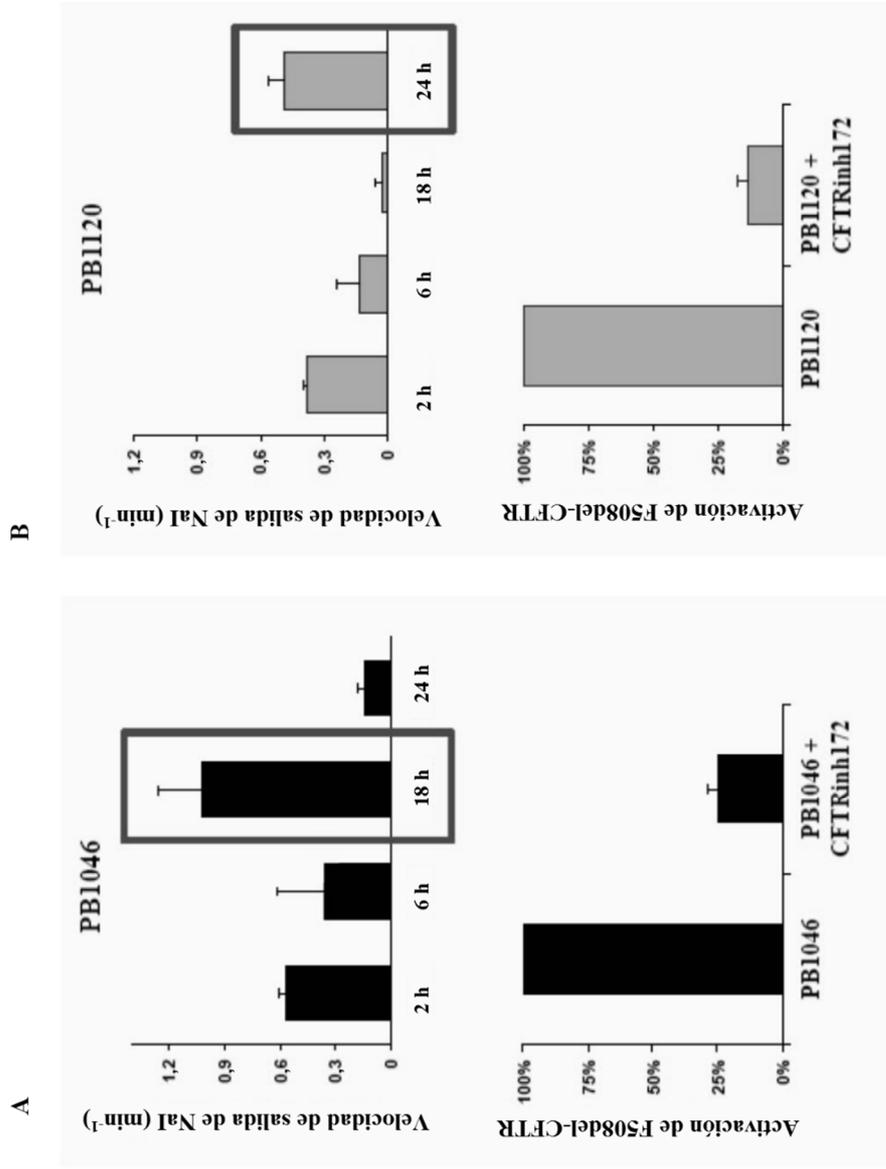


FIGURA 3C

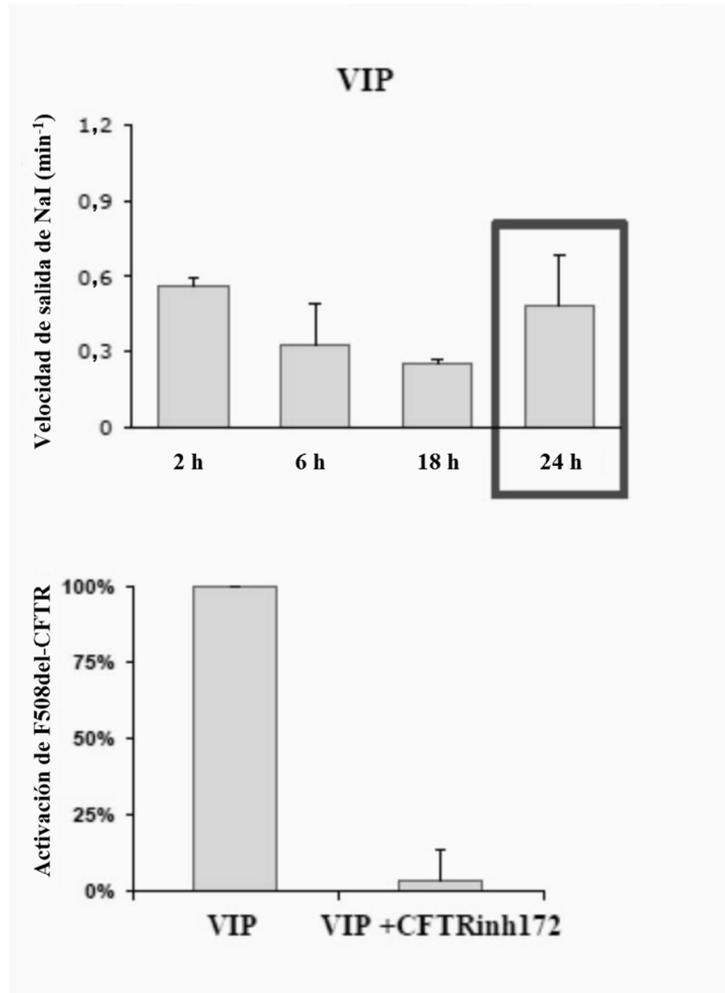


FIGURA 4

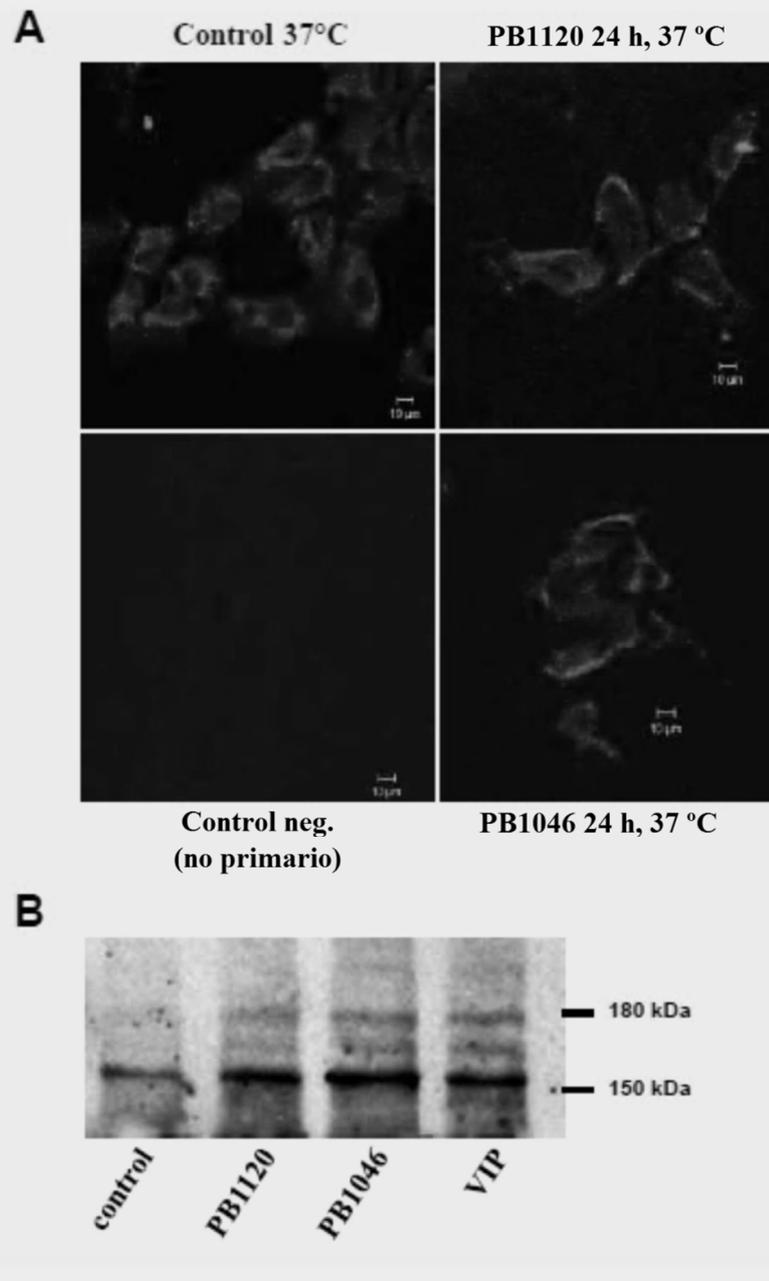
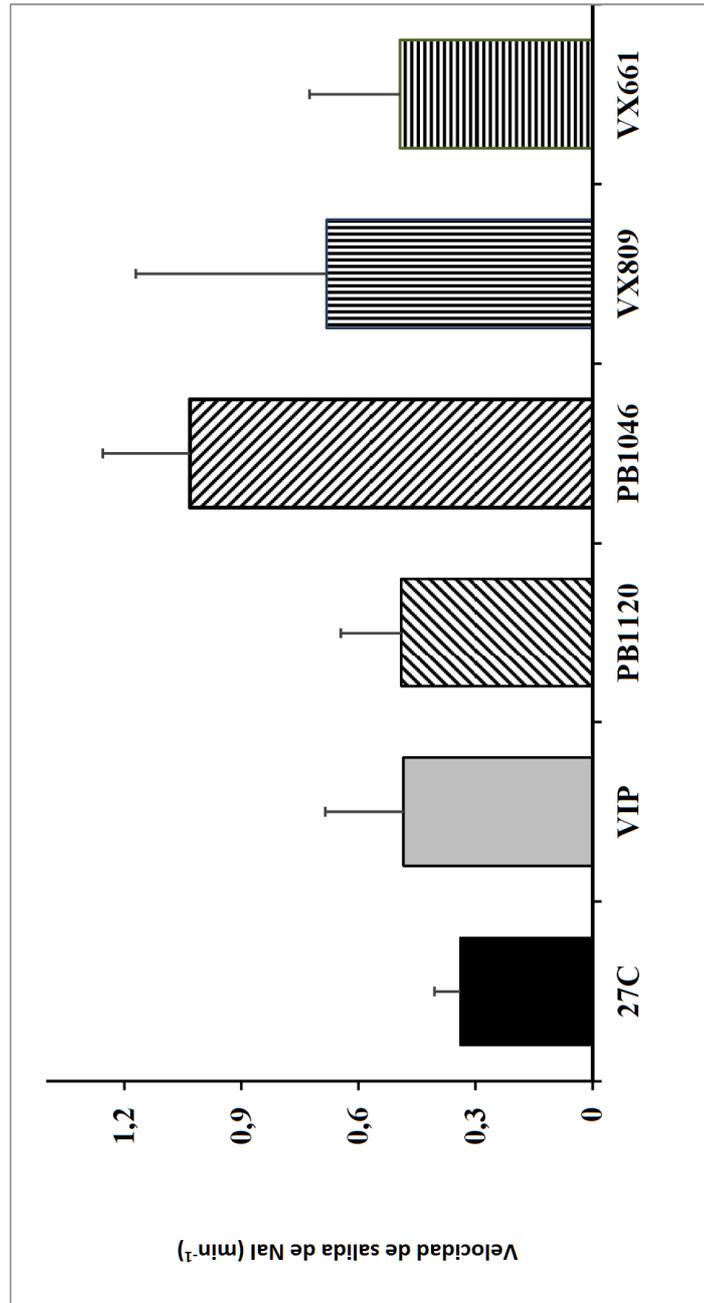


FIGURA 5



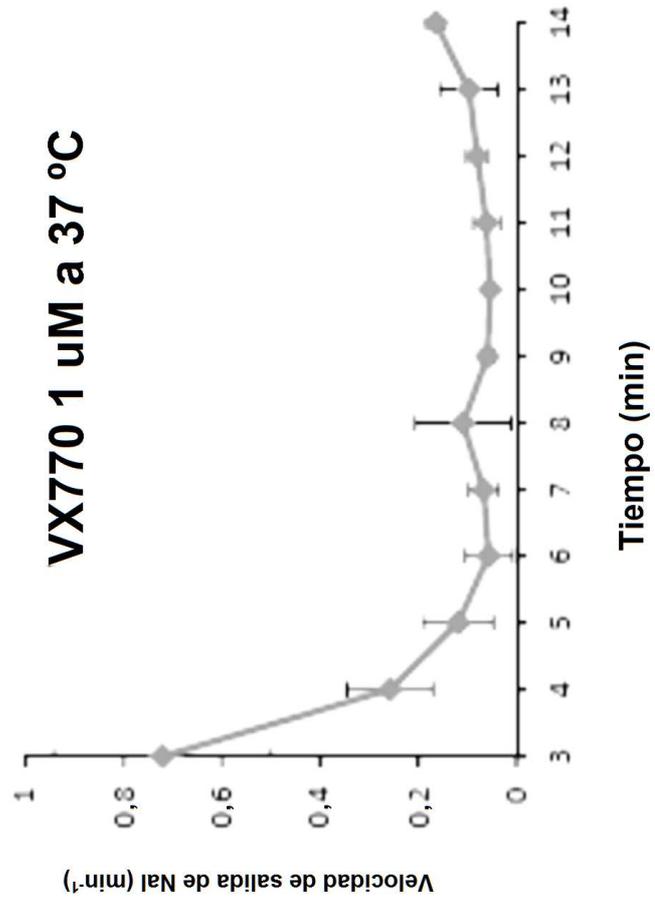


FIGURA 6A

Figura 6B

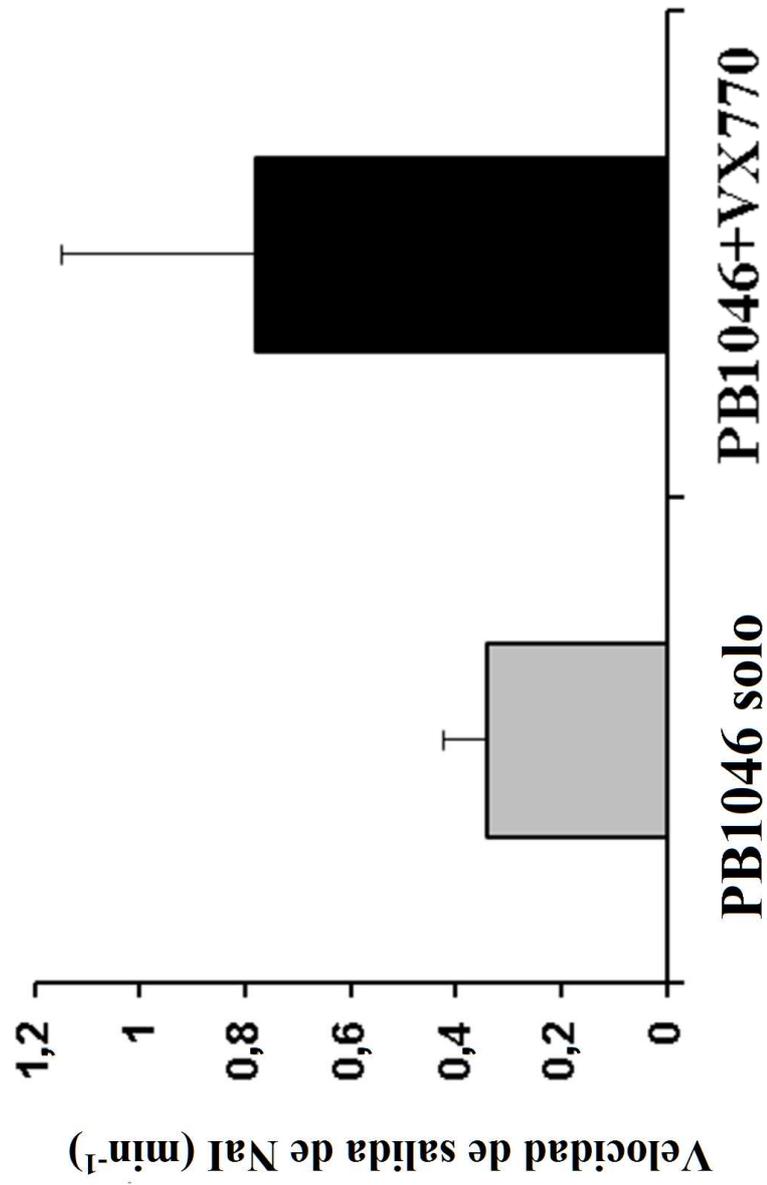
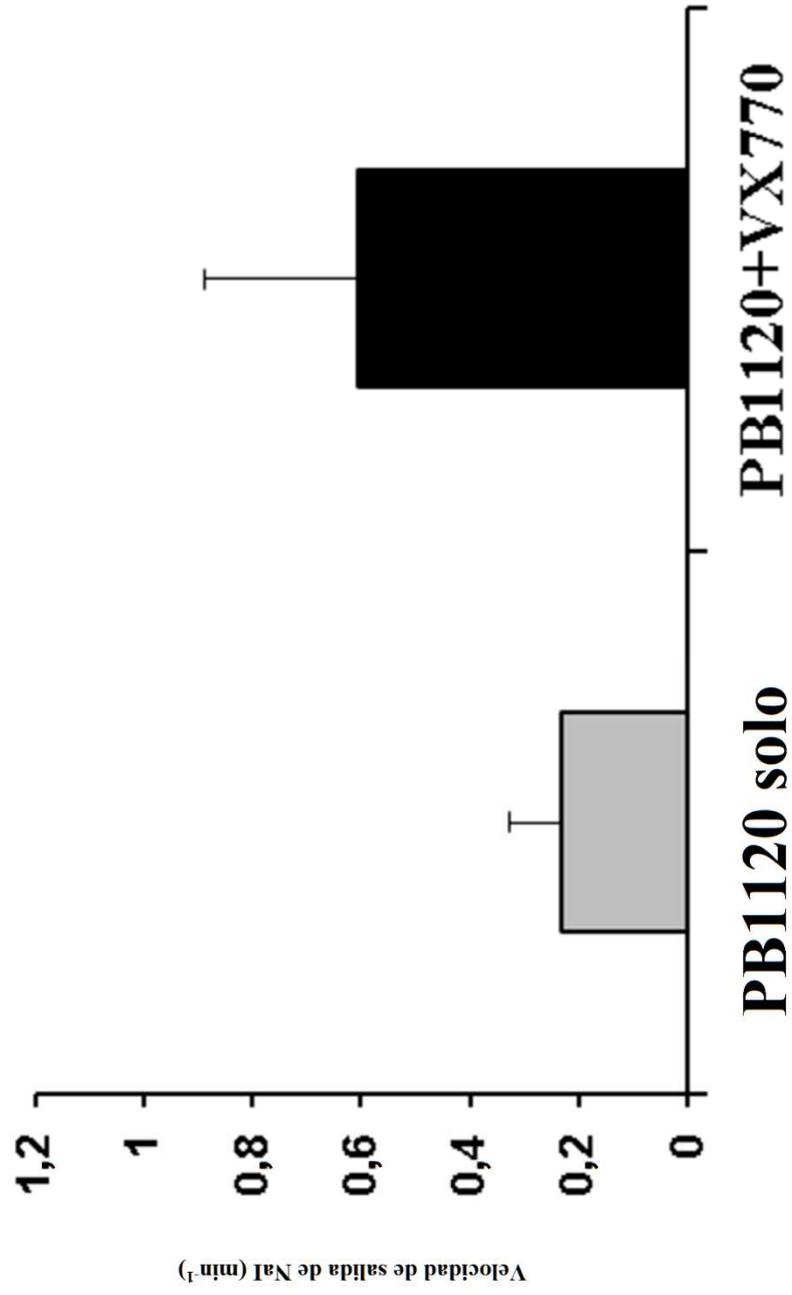


Figura 6C



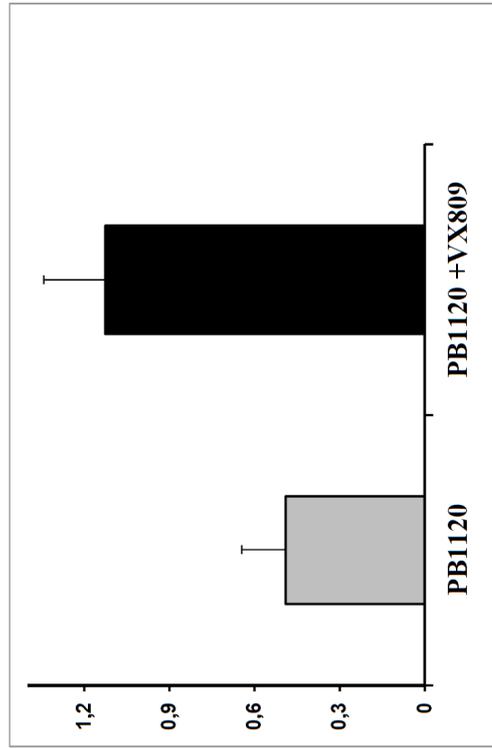


FIGURA 7

Velocidad de salida de NaI (min⁻¹)