



Europäisches
Patentamt
European
Patent Office
Office européen
des brevets



EP 2 219 663 B9

(12)

KORRIGIERTE EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(15) Korrekturinformation:

Korrigierte Fassung Nr. 1 (W1 B1)

Korrekturen, siehe

Bibliographie INID code(s) 72, 73

Ansprüche EN 1-5

Ansprüche FR 1-5

(48) Corrigendum ausgegeben am:

23.01.2013 Patentblatt 2013/04

(45) Veröffentlichungstag und Bekanntmachung des

Hinweises auf die Patenterteilung:

28.11.2012 Patentblatt 2012/48

(21) Anmeldenummer: **08858971.8**

(22) Anmeldetag: **12.12.2008**

(51) Int Cl.:

A61K 38/19 (2006.01)

C07K 14/525 (2006.01)

(86) Internationale Anmeldenummer:

PCT/AT2008/000447

(87) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 2009/073908 (18.06.2009 Gazette 2009/25)

(54) REVERSES PROTEIN

REVERSE PROTEIN

PROTÉINE EN PHASE INVERSE

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR
HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MT NL NO PL PT
RO SE SI SK TR**

(30) Priorität: **12.12.2007 AT 20152007**

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:

25.08.2010 Patentblatt 2010/34

(73) Patentinhaber: **Apeptico Forschung und
Entwicklung GmbH
1150 Wien (AT)**

(72) Erfinder:

- FISCHER, Bernhard
A-1160 Wien (AT)**
- LUCAS, Rudolf
GA 30907 Martinez (US)**

(74) Vertreter: **Schwarz & Partner**

**Patentanwälte
Wipplingerstraße 30
1010 Wien (AT)**

(56) Entgegenhaltungen:

WO-A1-00/09149

- DATABASE Geneseq [Online] 18. November 2004 (2004-11-18), "Target molecule binding peptide #91." XP002516878 gefunden im EBI accession no. GSN:ADR75507 Database accession no. ADR75507 -& DATABASE Geneseq [Online] 18. November 2004 (2004-11-18), "Target molecule binding peptide #49." XP002516879 gefunden im EBI accession no. GSN:ADR75465 Database accession no. ADR75465 -& EP 1 452 868 A2 (PEPSCAN SYSTEMS BV [NL]) 1. September 2004 (2004-09-01)**

EP 2 219 663 B9

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents im Europäischen Patentblatt kann jedermann nach Maßgabe der Ausführungsordnung beim Europäischen Patentamt gegen dieses Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist. (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Reverses Protein, nämlich ein Tumor Nekrose Faktor-Protein (Polypeptid), das N-terminal aus einem oder mehreren C-terminalen Teilen der Aminosäuresequenz des reifen Tumor Nekrose Faktors (TNF), und C-terminal aus einem oder mehreren N-terminalen Teilen der Aminosäuresequenz des TNF zusammengesetzt ist, wobei das Protein als Medikament verwendet werden kann, z.B. zur Behandlung von Lungenödemen.

[0002] Der Flüssigkeitstransport durch Zellschichten und Gewebe beruht primär auf einem osmotischen Gradienten durch einen aktiven vektoriellen Ionentransport, z.B. Natriumtransport. Dieser wird hauptsächlich durch streng regulierten und vital bedeutenden Ionenkanäle, wie z.B. dem Epithelial Natrium- Kanal Komplex (ENaC), bewerkstelligt. Wasser folgt diesem Gradienten passiv, unter anderem durch spezielle Wasserkanäle, wie dem Wasserkanal Aquaporin V. Für das Lungengewebe ist bekannt, dass basolateral an den pumpenden Zellen Na+/K+ ATPasen den vektoriellen Transport von Natrium ins Interstitium betreiben und schließlich die Ionen in die Lymph- und Blutgefäße an. Dieser Transport ist also aktiv und erfolgt unabhängig vom transpulmonalen Druck und der alveolären Proteinkonzentration.

[0003] Ein Ödem ist eine pathologische Flüssigkeitsansammlung in einem Organ, wie z.B. der Lunge, aber auch dem Gehirn oder der Haut. Bei einem Ödem in der Lunge spricht man von einem Lungenödem. Das Lungenödem basiert meist auf dem Ungleichgewicht zwischen Flüssigkeitsextravasation und Flüssigkeitsrückresorption. Sehr oft ist auch die Permeabilität des Lungengewebes geschädigt, sodass eine vermehrte Flüssigkeitszufuhr stattfindet, und sich die Flüssigkeit in den Lungenbläschchen (Alveolen) ansammelt..

[0004] Eine solche Permeabilitätsstörung als Folge eines fehlenden Rücktransports von Flüssigkeit aus den Lungenbläschchen in das Interstitium ist besonders bedeutsam bei der Akuten Lungen Verletzung (engl. Acute Lung Injury, ALI) oder beim Akuten Respiratorischen Distress Syndrom (engl. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS) oder beim schweren akuten Atemnotsyndrom (SARS), bei der Pneumonie und beim Multiorganversagen. Die Permeabilitätsstörung spielt aber auch eine Rolle bei anderen Lungenerkrankungen, wie Beatmung-induzierter Lungenschäden, Lungentransplantationen, Transfusion-assoziierten Lungenschäden, therapeutischer Gabe von IL-2 oder Asthma.

[0005] Als Ergebnis einer erhöhten Flüssigkeitsansammlung im Gewebe oder Organ, z.B. der Lunge, wird der notwendige Gasaustausch behindert oder völlig eingeschränkt. Es kommt kein Sauerstoff aus der Atemluft in das Blut, sodass durch Sauerstoffmangel lebensgefährliche Organschäden auftreten können.

[0006] Es gibt keine generelle Standardtherapie zur Behandlung für das Permeabilitätsödem. Allgemein bemüht man sich Patienten mit einem Lungenödem künstlich zu beatmen, um die Zufuhr von Sauerstoff ins Blut und somit zu den Organen zu gewährleisten.

[0007] Aus der DE 38 41 759 sind einzelne, vom TNF abgeleitete Peptide bekannt.

[0008] Von Carswell et al. in Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666, 1975 wurde berichtet, dass das Serum von Endotoxin-behandelten Tieren, die zuvor mit dem Mycobakterien-Stamm Calmette-Guerin (BCG) infiziert worden waren, eine hämorrhagische Nekrose bei verschiedenen Tumoren in der Maus bewirkte. Diese Aktivität wurde dem Tumor Nekrose Faktor (TNF) zugeschrieben. TNF zeigt auch eine zytostatische oder zytotoxische Wirkung gegenüber einer Vielzahl von transformierten Zelllinien in vitro, während normale menschliche und tierische Zelllinien davon nicht betroffen werden (M. R. Ruff et al, Lymphokines, Vol. II, Academic Press Inc., New York, 1981, pp 235-275). Die biochemische Charakterisierung und das Gen für menschlichen TNF wurde bereits beschrieben (D Pennica et al, Nature 312, 724, 1984; Aggarwal, B. B. et al, J. Biol. Chem. 260, 2334-2345, 1985; Nedwin, G.E. et al, Nucl. Acids Res. 13, 6361, 1985).

[0009] Aus diesen Daten konnte die folgende Proteinstruktur für den humanen reifen Tumor Nekrose Faktor (TNF) abgeleitet werden:

(NH₂)Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu(COOH)

[0010] Weiterhin wurde das TNF-Gen von Rind, Kaninchen und Maus beschrieben (Goeddel D. V. et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 51, 597, 1986).

[0011] Neben seinen zytotoxischen Eigenschaften ist TNF mit hauptbeteiligt an entzündlichen Reaktionen (J.W. Lerrick et al, Pharmac. Res. Vol. 5, No. 3, 129-139, 1988). Im Tiermodell konnte die Beteiligung von TNF beim septischen Schock (Torti F. M. et al, Science 229, 867-869, 1985) und der Graft versus Host Disease (Piguet, P F et al, J. Exp. Med. 166, 1280, 1987) gezeigt werden.

[0012] Aus biochemischen Untersuchungen ist bekannt, dass das humane TNF aus verschiedenen strukturellen Elementen besteht, wie in TABELLE 1 aufgelistet:

TABELLE 1

Strukturelement	Position der Aminosäuren
β-STRAND 1	30-32
β-STRAND 2	45-49
β-STRAND 3	54-71
β-STRAND 4	76-83
β-STRAND 5	85-87
β-STRAND 6	91-98
β-STRAND 7	101-103
U-Tum 8	104-106
β-STRAND 9	107-109
β-STRAND 10	113-126
β-STRAND 11	131-137
α-HELIX 12	139-141
β-STRAND 13	147-153

[0013] In Lucas R et al, Science (1994) Vol. 263. no. 5148, pp. 814 - 817 ist ein Peptid beschrieben, das von der Region Ser(99) bis Glu(116) des TNF abgeleitet wurde, und welches zur Behandlung von Ödemen vorgeschlagen wird. Dieses Peptid ist auch Gegenstand von WO 00/09149. Um dieses Peptid der WO 00/09149 jedoch nutzbar zu machen, musste artifiziell die Position Pro(100) durch die Aminosäure Cystein und die Position Cys(101) durch die Aminosäure Glycin ersetzt werden. Da das lineare Peptid Ser(99) bis Glu(116) keine erfindungsgemäße Wirkung hatte (Hribar M. et al., Eur. J. Immunol. (1999), Vol.29, 3105-3111; Braun C., J. Immunol. (2005), 175: 3402-3408; Fukuda N. et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol (2001) 280: L1258-L1265), musste zusätzlich die Position Glu(116) durch die Aminosäure Cystein ersetzt werden, um die Struktur zu erhalten und um einen Ringschluss zwischen den beiden Aminosäuren Cystein zu ermöglichen.

[0014] Ein Nachteil des, in WO00/09149 beschriebenen, Peptides besteht darin, dass dieses Peptid artifizielle, nämlich so nicht in TNF enthaltende Aminosäuresequenzen enthält. Ein solches, mit artifiziellen Strukturen versehenes, Peptid wird durch das menschliche Immunsystem als körperfremd erkannt. Eine wiederholte oder andauernde Verabreichung eines solchen Peptides in medikamentöser Form kann lebensbedrohende Immunreaktionen hervorrufen.

[0015] Es wurde nun überraschend gefunden, dass sich ein Protein, das aus Teilen der Aminosäuresequenz des reifen Tumor Nekrose Faktors (TNF) zusammengesetzt ist interessante biologische Eigenschaften aufweist, wobei ein solches Protein keine artifizielle Aminosäuresequenzen enthält.

[0016] In einem Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Protein, ausgewählt aus den Aminosäuresequenzen **SEQ ID: NO:1**

(NH₂)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val (COOH); und **SEQ ID: NO:2**

(NH₂)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser(COOH), worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, zur Verfügung,

[0017] Der reife Tumor Nekrose Faktor (TNF) wie hierin verwendet, ist bevorzugt der humane reife Tumor Nekrose Faktor.

[0018] Ein Protein, das gemäß vorliegender Erfindung zur Verfügung gestellt wird, wird hierin auch als "Protein gemäß (nach) vorliegender Erfindung" bezeichnet.

[0019] Teile der Aminosäuresequenz des reifen Tumor Nekrose Faktors (TNF) werden hierin auch als "strukturellen Elementen des Tumor Nekrose Faktor (TNF)" bezeichnet.

[0020] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung ist N-terminal aus einem oder mehreren C-terminalen strukturellen Elementen des reifen Tumor Nekrose Faktor und C-terminal aus einem oder mehreren N-terminalen strukturellen Elementen des reifen Tumor Nekrose Faktor zusammengesetzt ist, z.B. in der Form eines Fusionsproteins.

[0021] Strukturellen Elemente des reifen Tumor Nekrose Faktor sind in TABELLE 1 definiert.

[0022] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung schliesst ein Fusionsprotein ein, zusammengesetzt aus Teilen der Aminosäuresequenz des humanen TNF wie oben definiert, z.B. aus strukturellen Elementen des TNF.

[0023] Es wurde weiterhin gefunden, dass es besonders vorteilhaft ist es, wenn ein Protein gemäß vorliegender Erfindung N-terminal aus den C-terminalen strukturellen Elementen β -Strand 6 bis β -Strand 10, oder β -Strand 8 bis β -Strand 9. des TNF, und C-terminal aus den N-terminalen strukturellen Elementen β -Strand 2 bis β -Strand 3, oder β -Strand 3 des TNF abgeleitet ist, mit der Maßgabe, dass zumindest zwei Cysteinreste enthalten sind.

[0024] Gemäß vorliegender Erfindung wurden besonders geeignete Proteine mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID:NO:1 und SEQ ID:NO:2, worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, gefunden.

[0025] In einem Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID:NO 1 leitet sich der N-terminale Anteil des Proteins Ala (96) bis Lys(112) aus den C-terminalen strukturellen Elementen β -Strand 6 bis β -Strand 9 des humanen TNF ab, und der C-terminale Anteil Gly(68) bis Val(74) aus dem N-terminalen strukturellen Element β -Strand 2 und β -Strand 3 des humanen TNF ab. Die Ziffern (96), (112), (68) und (74) bezeichnen die Positionen der Aminosäuren im humanen TNF.

[0026] In einem Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID:NO 2 leitet sich der N-terminale Anteil des Proteins Lys (98) bis Lys(112) aus den C-terminalen strukturellen Elementen β -Strand 7 bis β -Strand 9 des humanen TNF, und der C-terminale Anteil des reversen Fusionsproteins Gly(68) bis Ser(71) aus dem N-terminalen strukturellen Element β -Strand 3 des humanen TNF ab. Die Ziffern (98), (112), (68) und (71) bezeichnen die Positionen der Aminosäuren im humanen TNF.

[0027] Weiterhin wurde überraschenderweise gefunden, dass in einem Protein gemäß vorliegender Erfindung ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, z.B. ein Ringschluss durch Bindung zwischen einem Cysteinrest, der aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des TNF stammt, mit einem Cysteinrest, der aus der C-terminalen Aminosäuresequenz des TNF stammt; z.B. ein Ringschluss durch eine Disulfidbindung zwischen den jeweiligen Schwefelmolekülen der beiden Cysteinreste.

[0028] In den Proteinen SEQ ID NO:1 UND SEQ ID NO:2 kommt es zwischen den beiden Cysteinen, die den Cysteinen Cys(101) und Cys(69) im humanen TNF entsprechen, zu einem Ringschluss.

[0029] Eine Disulfidbindung kann z.B. hydrolytisch oder enzymatisch aufgespaltet werden, und ob ein Protein gemäß vorliegender Erfindung in zyklischer oder nicht-zyklischer Form vorliegt, hängt von den Umgebungsbedingungen ab.

[0030] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung liegt in reiner, isolierter Form in zyklischer Form vor.

[0031] In der Struktur des humanen TNF ist kein Ringschluss durch Disulfidbindung zwischen den jeweiligen Schwefelmolekülen zweier Cysteinreste ausgebildet.

[0032] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung kann in freier Form vorliegen, oder in der Form eines Salzes, z.B. in der Form eines Säureadditionssalzes, wie ein Acetatsalz, oder ein Trifluoressigsäuresalz und in einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Protein gemäß vorliegender Erfindung in der Form eines Salzes zur Verfügung.

[0033] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung kann in geeigneter Weise hergestellt werden, z.B. analog zu einem bekannten Verfahren, wie durch chemische Synthese mittels Peptidchemie oder mittels mikrobieller Verfahren, beispielsweise wie hierin beschrieben.

[0034] Es hat sich gezeigt, dass ein Protein gemäß vorliegender Erfindung interessante biologische Aktivität zeigt und daher als Medikament verwendet werden kann.

[0035] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Protein gemäß vorliegender Erfindung zur Verwendung als ein Medikament zur Verfügung, z.B. Die Verwendung eines Proteins gemäß vorliegender Erfindung als ein Medikament.

[0036] Beispielsweise zeigen biologische Untersuchungen an humanen Zellen, dass ein Protein gemäß vorliegender Erfindung, auch im Unterschied zum (humanen) TNF, praktisch keine entzündlichen oder toxischen Eigenschaften aufweisen. Zur Untersuchung werden in laborüblicher Weise humane Immunzellen aus dem Blut mit Protein gemäß vorliegender Erfindung in geringer Konzentration gemischt und inkubiert. Anschließend werden mittels üblichen Methoden Markerproteine für Entzündungen bestimmt. Trotz Zugabe eines Proteins der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2, worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, gemäß vorliegender Erfindung können solche Entzündungsproteine, wie z.B. der Entzündungsmarker Interleukin-6 (IL-6), nicht nachgewiesen werden.

[0037] Es wird erwartet, dass ein Protein gemäß vorliegender Erfindung in einem Verfahren zur Vermeidung von Entzündungen, z.B. zur Vermeidung der Bildung von Entzündungsmarkern, wie IL-6, bei der medizinischen Anwendung von Proteinen, die vom Tumor Nekrosis Faktor, z.B. vom humanen Tumor Nekrosis Faktor, abgeleitet sind, verwendet werden kann.

[0038] Es ist weiterhin eine laborübliche Methode und zum Beispiel in Clunes M.T. et al, J Physiol Volume 557, Number 3, 809-819 (June 15, 2004) beschrieben, die Aktivierung von Ionenkanälen mittels Patch-Clamp Experimenten nachzuweisen. Für Patch-Clamp Untersuchungen von Ionenkanälen wird eine Glaskanüle dünn ausgezogene und mit neutraler Pufferlösung gefüllt. Die Glaskanüle (Patch-Clamp-Pipette) wird vorsichtig auf eine intakte epitheliale Zelle gedrückt. Unterhalb der Pipette befindet sich ein Stück Membran. Zwischen dem Inneren der Pipette und der Außenlösung entsteht dadurch ein elektrischer Widerstand. In die Pipettenlösung taucht eine Elektrode, die an einen empfindlichen

Verstärker angeschlossen ist.

[0039] Es ist nun überraschend zu finden, dass ein Protein der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2, worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, gemäß vorliegender Erfindung die epithelialen Ionenkanäle aktiviert, was durch die Veränderung der elektrischen Spannung vs. Stromstärke nachweisbar ist.

[0040] Zur Simulation eines Akuten Lungenschadens und zur Bildung eines Lungenödems kann in laborüblicher Weise die Lunge von Versuchstieren, z.B. Mäusen oder Ratten, mehrmals mit angesäuerter Kochsalzlösung gespült werden (zum Beispiel gemäß Isik F. et al., Eur J Cardiothorac Surg (2005); 28: 301-305). Dadurch kommt es zur Herabsetzung der Lungenfunktion. Wird nun in die Lunge der Versuchstiere ein Proteins der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2, worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, gemäß vorliegender Erfindung als Nebel oder in wässriger Lösung injiziert, so kommt es innerhalb von 3 bis 5 Stunden zu einer deutlichen Verbesserung der Lungenfunktion, angezeigt durch gestiegenen Sauerstoffgehalt im arteriellen Blut.

[0041] Somit kann ein Protein gemäß vorliegender Erfindung zur Behandlung von Ödemen, wie Lungenödemen, verwendet werden.

[0042] Es wird erwartet, dass ein Protein gemäß vorliegender Erfindung auch zur Behandlung weiterer Krankheiten, die mit der Lungenfunktion assoziiert sind, eingesetzt werden kann, z. B. zur Herstellung eines Medikamentes zur Behandlung von Krankheiten, die mit der Lungenfunktion assoziiert sind.

[0043] Die Behandlung von Krankheiten, die mit der Lungenfunktion assoziiert sind, schließt z.B. die Aktivierung epithelialer Ionenkanäle, die Verbesserung der Lungenfunktion und/oder die Behandlung von Ödemen, wie Lungenödemen, die Behandlung

- der Akuter Lungen Verletzung (engl. Acute Lung Injury, ALI),
- des Akuter Respiratorischen Distress Syndrom (engl. Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS),
- des schweren akuten Atemnotsyndrom (SARS),
- der Pneumonie,
- bei Multiorganversagen,
- bei Beatmung-induzierter Lungenschäden, bei Lungentransplantationen, Transfusionassozierterlungenschäden, therapeutischer Gabe von IL-2 oder Asthma

ein, z.B. die Aktivierung epithelialer Ionenkanäle, die Verbesserung der Lungenfunktion und/oder die Behandlung von Ödemen, wie Lungenödemen.

[0044] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Protein gemäß vorliegender Erfindung zur Verwendung bei der Behandlung von Lungenödemen zur Verfügung, wobei erwartet wird, dass ein Protein gemäß vorliegender Erfindung neben der Verwendung zur Behandlung von Lungenödemen auch bei der Behandlung weiteren Krankheiten, die mit der Lungenfunktion assoziiert sind, durch Verabreichung in eine ausreichende Menge an einen Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, verwendet werden kann.

[0045] Ein Patient, wie hierin verwendet, schließt Säugetiere, z.B. Menschen ein.

[0046] Ein Protein gemäß vorliegender Erfindung kann in der Form einer pharmazeutischen Zubereitung verabreicht werden.

[0047] In einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zubereitung zur Verfügung, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein Protein gemäß vorliegender Erfindung umfasst, z.B. in Verbindung mit zumindest einem pharmazeutisch akzeptablen Hilfsstoff, wie Träger oder Verdünnungsmittel, beispielsweise Füllstoffe, Bindemittel, Verbesserer der Fließeigenschaften, Gleitmittel, Geschmacksstoffe, Zucker oder Süßstoffe, Geruchsstoffe, Konservierungsstoffe, stabilisierend wirkende Stoffe, Netzmittel, Emulgatoren, Lösungsvermittler, Salze zur Regulierung des osmotischen Drucks und/oder Puffer(mischungen).

[0048] Die geeignete Menge eines Proteins gemäß vorliegender Erfindung zur Behandlung von Krankheiten wird natürlich sehr von verschiedenen Parametern abhängen, beispielsweise der chemischen Natur und der Pharmakokinetik des verwendeten Proteins, dem individuellen Patienten, der zu behandelnden Krankheit, der Art der Anwendung, aber eine erfolgreiche tägliche Dosis in größeren Säugetieren schließt beispielsweise eine Menge von 0.0001 g bis 1.5 g ein, z.B. 0.001 mg/kg Körpergewicht bis etwa 20 mg/kg Körpergewicht, ein. Die Anwendung kann enteral oder parenteral erfolgen und erfolgt bevorzugt parenteral. Eine pharmazeutische Zubereitung gemäß vorliegender Erfindung kann in geeigneter Weise hergestellt werden, z.B. analog einer bekannten Methode, z.B. durch Misch-, Granulier-, Beschichtungs-, Lösungs-, Lyophilisierungsverfahren.

Beschreibung der Abbildungen

[0049]

Fig. 1A zeigt das HPLC Chromatogramm des Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1. Einheiten: y-Achse: Absorption in mV; x-Achse: Zeit in Minuten.

Fig. 1B zeigt das HPLC Chromatogramm des Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2. Einheiten: y-Achse: Absorption in mAU x-Achse: Zeit in Minuten.

5 Fig. 2A, rechte Abbildung, zeigt die Aktivierung von Natrium Ionenkanälen durch ein Protein der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1,

[0050] In den Fig. 1A, 1B und 2a sind die Proteine Proteine der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 1 oder SEQ ID NO: 2, worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt, detektiert durch Patch Clamp. 10 Linke Abbildung in der Fig. 2A im Vergleich. ohne Protein. Einheiten: y-Achse: Stromstärke in pA; x-Achse: Zeit in Sekunden.

[0051] Fig. 2B, rechte Abbildung, zeigt die Aktivierung von Natrium Ionenkanälen durch ein Protein der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2, detektiert durch Patch Clamp. Linke Abbildung in der Fig. 2B im Vergleich ohne Protein. Einheiten: y-Achse: Stromstärke in pA; x-Achse: Zeit in Sekunden.

15 [0052] Fig. 3A zeigt die Erhöhung des Sauerstoffgehalts im arteriellen Blut nach Verabreichung eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1. Einheiten: y-Achse: Sauerstoffgehalt in %; x-Achse: Messzeitpunkt in Minuten.

[0053] Fig. 3B zeigt die Erhöhung des Sauerstoffgehalts im arteriellen Blut nach Verabreichung eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2. Einheiten: y-Achse: Sauerstoffgehalt in %; x-Achse: Messzeitpunkt in Minuten.

[0054] In den Beispielen werden folgende Abkürzungen verwendet:

20 TFA Salz Salz der Trifluoressigsäure

[0055] Die isolierten Proteine der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 sind zuklische Proteine, worin 25 jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt,

Beispiel 1: Synthese eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1

[0056] Ein Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 wurde mittels Fmoc-Festphasensynthese vollautomatisch 30 in folgenden Schritten synthetisiert:

Schritt	Prozess	Produkt
1	Kopplung der Aminosäuren	Peptid gebunden an die Festphase
2	Abspaltung von der Festphase	Peptid in Lösung
3	Reinigung	Gereinigtes Peptid als TFA-Salz
4	Reinigung / Salz Austausch / oxidative Zyklisierung	Gereinigtes Peptid als Acetatsalz
5	Analytische Untersuchung	Gereinigtes Peptid

40 [0057] Die Zyklisierung wurde durch Herausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Cystein (Position 6) und Cysten (Position 20) erreicht. Dies erfolgt zum Beispiel durch Sauerstoffoxidation der Schwefelatome in den Seitenketten des Cysteins (Position 6) und des Cystens (Position 20) unter Herausbildung einer Disulfidbrücke, was zum Ringschluss führt.

45 [0058] Anschließend wurde das Protein mittels Reverser HPLC untersucht, wobei das Ergebnis, wie in Fig. 1A gezeigt, erhalten wurde.

Beispiel 2: Synthese eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2

50 [0059] Ein Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2 wurde mittels Fmoc-Festphasensynthese vollautomatisch in folgenden Schritten synthetisiert:

Schritt	Prozess	Produkt
1	Kopplung der Aminosäuren	Peptid gebunden an die Festphase
2	Abspaltung von der Festphase	Peptid in Lösung

(fortgesetzt)

Schritt	Prozess	Produkt
3	Reinigung	Gereinigtes Peptid als TFA-Salz
4	Reinigung / Salz Austausch / oxidative Zyklisierung	Gereinigtes Peptid als Acetatsalz
5	Analytische Untersuchung	Gereinigtes Peptid

10 [0060] Die Zyklisierung wurde durch Herausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Seitenketten der Aminosäuren Cystein (Position 4) und Cysten (Position 18) erreicht. Dies erfolgt zum Beispiel durch Sauerstoffoxidation der Schwefelatome in den Seitenketten des Cysteins (Position 4) und des Cystens (Position 18) unter Herausbildung einer Disulfidbrücke, was zum Ringschluss führt.

15 [0061] Anschließend wurde das Protein mittels Reverser HPLC untersucht, wobei das Ergebnis, wie in Fig. 1B gezeigt, erhalten wurde:

Beispiel 4: Zellkultur

20 [0062] Die elektrophysiologischen Experimente wurden an humanen A549 Zellen (ATTC Nr. CCL-185) durchgeführt. A549 Zellen sind humane Lungenepithelzellen, die an der Diffusion von Wasser und Elektrolyten in der Lunge beteiligt sind.

25 [0063] Die Zellen wurden in DMEM-F-12 Medium mit 1% Penicillin-Streptomycin und 10% fötalem Kälberserum suspendiert, in Plastizellkulturgefäße überführt und im Inkubator bei 95% Luft und 5% CO₂ bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde 2- bis 3-mal in der Woche gewechselt. Die Zellen verdoppeln sich in ca. 22 Stunden und eine Zellkonzentration von über 7 x 10⁴ Zellen pro cm² wurde nicht überschritten.

Beispiel 5: Aktivierung von Ionenkanälen humaner Epithelzellen durch Proteine mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2

30 [0064] Makroskopische Ströme und Einzelkanalströme wurden von A549 Zellen in der "whole cell" und "cell-attached" Konfiguration der "Patch-clamp" Technik (Hamill et al, Pflugers Arch. 1981, 391(2):85-100., 1981) abgeleitet. Für die Stromableitungen in der "whole cell" Konfiguration wurden folgende Bad- und Elektrodenlösungen verwendet:

35 Badlösung: 135 mM Natrium Methansulfonat, 10 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 2 mM MgCl₂, 5.5 mM Glucose, und 10 mM HEPES, pH 7.4.

40 Elektrodenlösung: 120 mM Kaliummethylsulfonat, 15 mM KCl, 6 mM NaCl, 1 mM Mg₂ATP, 2 mM Na₃ATP, 10 mM HEPES, and 0.5 mM EGTA (pH 7.2).

45 [0065] Die Deckgläser mit den darauf kultivierten Zellen wurden in ein 1 ml fassendes Versuchsbad transferiert, auf dem Mikroskopisch (Axiovert 100, 400-fache Vergrößerung) fixiert und die Zellen mit der oben beschriebenen Badlösung superfundiert. Sodann wurde von einer geeigneten Zelle (welche am Deckglas haftet) der Strom abgeleitet. Dazu wurde eine mit einer Elektrolytlösung gefüllte Mikroelektrode (Glaskapillare mit einer definierten, Hitzepolierten Spitzenöffnung von ca. 1-3 µm, entspricht einen Widerstand der Elektrodenspitze von 3-5 Ω) auf die Zelle aufgesetzt und die Membran angesaugt, sodass ein "Gigaohm-Seal" zwischen Membran und Elektrode gebildet wurde, um den Leckstrom zu minimieren. In der "cell-attached"-Konfiguration kann der Strom durch einzelne Ionenkanäle unter der Elektrodenspitze gemessen werden. Bei der "whole cell"-Konfiguration wurde die Membran unter der Elektrodenspitze durchbrochen, damit der Strom, der durch alle Ionenkanäle der Zelle fließt, gemessen werden kann. Die Ableitung der makroskopischen Ströme kann auch mit Hilfe der "perforated patch clamp" Technik durchgeführt werden. Bei der "whole cell" Ableitung wurde der Ionophor Amphotericin der Pipettenlösung zugesetzt, wodurch die Membran unter der Spitzenöffnung durchlässig wurde und Ströme in der "whole cell" Konfiguration abgeleitet werden können. Bei Erhalt eines Gigaohm-Seals wurde über einen Vorverstärker (CV-4 Headstage, Axon Instruments) und Verstärker (Axopatch 1D, Axon Instr.) ein definiertes Membranhaltepotential angelegt und der Strom, der dabei durch die Ionenkanäle fließt, gemessen.

50 [0066] Das Pulsprotokoll bestand aus einer Hyperpolarisation auf -100 mV für 1 s im Abstand von 5 s. In weiterer Folge wurde dann in Schritten von 20 mV schließlich die Membran bis zu +100 mV depolarisiert. Dieses Protokoll wurde unter Zugabe von synthetischen Proteinen mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2, sowie mit dem Natriumkanal-Inhibitor Amilorid durchgeführt. Die so erhaltenen Stromableitungen wurden gespeichert und mit Hilfe des Programms PCLAMP 6.0 analysiert. Dazu wurden die, unter Anwesenheit von Amilorid erhaltenen, Stromableitungen von den vorher registrierten Strömen subtrahiert, sodass der Amilorid-sensitive Natriumstrom durch die epithelialen

Natriumkanäle ermittelt werden konnte.

[0067] Die Resultate, in denen die Aktivierung der Natrium Ionenkanäle durch die Proteine mit den Aminosäuresequenzen SEQ ID NO:1 und SEQ ID NO:2 gezeigt wird, sind aus Fig. 2A und Fig. 2B ersichtlich.

5 **Beispiel 6: Experimentelle Tierstudie Lungenödem**

[0068] Männliche Wistar Ratten (Gewicht 250 g bis 350 g) werden mit Rompun® (0,02 ml/100g) und Ketavet® (0,1 ml/100g) anästhesiert. Die Beatmung erfolgt mit einem Zyklus von 72 Stößen / Minute, bei einer Einatmungszeit von 0,2 Sekunden und einer Ausatmungszeit von 0,5 Sekunden. Die Körpertemperatur beträgt durchschnittlich 37°C bis 10 39°C. Im Normalzustand beträgt der PaO₂ (arterieller Sauerstoffpartialdruck) 500 bis 550 mm Hg. Zur Simulation eines Akuten Lungenschadens und zur Bildung eines Lungenödems wird die Lunge 7 bis 9 mal mit angesäuerter Kochsalzlösung (pH 5) gespült.

[0069] Nach einer Stunde werden jeweils die Proteine mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO: 2, gelöst in steriler Kochsalzlösung, intratracheal als Nebel verabreicht (Maximales verabreichtes Volumen 0,5 ml).

15 [0070] In einem Abstand von jeweils 60 Minuten wird den Tieren arterielles Blut entnommen (0,1 ml) und der Sauerstoffgehalt in % zum Normalwert bestimmt.

[0071] Nach Verabreichung eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 ist der Sauerstoffanteil im Blut erhöht, wie aus Fig. 3A oder Fig.3B ersichtlich, siehe auch Beispiel 7.

20 **Beispiel 7: Verbesserung der Lungenfunktion**

[0072] Der Nachweis der stimulierenden Wirkung eines Proteins mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1 oder SEQ ID NO:2 gemäß vorliegender Erfindung auf die Lungenfunktion erfolgt mittels tierexperimentellen Studien, in welchem ein Lungenödem induziert wird. Die experimentelle Vorgehensweise ist im Beispiel 6 beschrieben. Zur Objektivierung der Messwerte werden jeweils 5 Tiere verwendet.

25 [0073] Zur intratrachealen Inhalation werden jeweils 125 µg Protein in 150 mM Kochsalzlösung pH 7,3 aufgelöst. Der Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes wird unmittelbar vor der Spülung der Lungen, 60 Minuten nach der Spülung der Lungen und 180 Minuten nach Spülen der Lunge gemessen.

[0074] Der Sauerstoffgehalt unmittelbar vor dem Lungenspülen wird mit 100% festgelegt. 60 Minuten nach dem jeweils 30 letzten Lungenspülen beträgt der Sauerstoffgehalt im Blut durchschnittlich nur 20%. Innerhalb von 3 Stunden erhöhte sich der prozentuale Sauerstoffgehalt auf Werte von

[0075] 60% bei Behandlung mit einem Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1, bzw. 63% bei Behandlung mit einem Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2

[0076] Ohne Zugabe von Protein kommt es innerhalb von 180 Minuten nach Lungenspülung zu keiner Verbesserung 35 der Lungenfunktion (Sauerstoffgehalt 20%).

[0077] Die Resultate sind dargestellt in

- 40
- Fig. 3A für ein Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:1,
 - Fig. 3B für ein Protein mit der Aminosäuresequenz SEQ ID NO:2,

Patentansprüche

1. Protein, ausgewählt aus den Aminosäuresequenzen

45 **SEQ ID:NO:1**
(NH₂)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-
Val(COOH); und
SEQ ID:NO:2
50 (NH₂)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser(COOH),

worin jeweils ein Ringschluss durch Bindung zwischen zwei Cysteinresten vorliegt.

- 55
2. Protein nach Anspruch 1 in der Form eines Salzes.
 3. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2, zur Verwendung als Medikament.
 4. Protein gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, zur Verwendung bei der Behandlung von Lungenödemen.

5. Pharmazeutischen Zubereitung, **dadurch gekennzeichnet, dass** sie ein Protein gemäß einem der Ansprüche 1 oder 2 umfasst.

5 **Claims**

1. Protein selected from the amino acid sequences

10 **SEQ ID:NO:1**

(NH₂)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val(COOH); and

15 **SEQ ID:NO:2**

(NH₂)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser(COOH),

wherein in each of the protein a ring closure is present by a bond between two cysteine moieties.

2. Protein according to claim 1 in the form of a salt.

3. Protein according to any one of claims 1 or 2 for use as a medicament.

- 20 4. Protein according to any one of claims 1 to 3 for use in the treatment of pulmonary oedemas.

5. Pharmaceutical preparation, **characterized in that** it comprises a protein according to any of claims 1 or 2.

25 **Revendications**

1. Protéine sélectionnée parmi les séquences d'acides aminés suivantes :

30 **SEQ ID:NO:1**

(NH₂)Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val(COOH); et

35 **SEQ ID:NO:2**

(NH₂)Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg-Glu-Thr-Pro-Glu-Gly-Ala-Glu-Ala-Lys-Gly-Gly-Cys-Pro-Ser(COOH),

dans chacune desquelles un cycle est fermé par liaison entre deux groupes cystéine.

2. Protéine selon la revendication 1, présentant la forme d'un sel.

- 40 3. Protéine selon l'une des revendications 1 ou 2, destinée à être utilisée comme médicament.

4. Protéine selon l'une des revendications 1 à 3, destinée à être utilisée pour le traitement de l'oedème des poumons.

5. Préparation pharmaceutique, **caractérisée en ce qu'**elle contient une protéine selon l'une des revendications 1 ou 2.

45

50

55

Fig. 1A

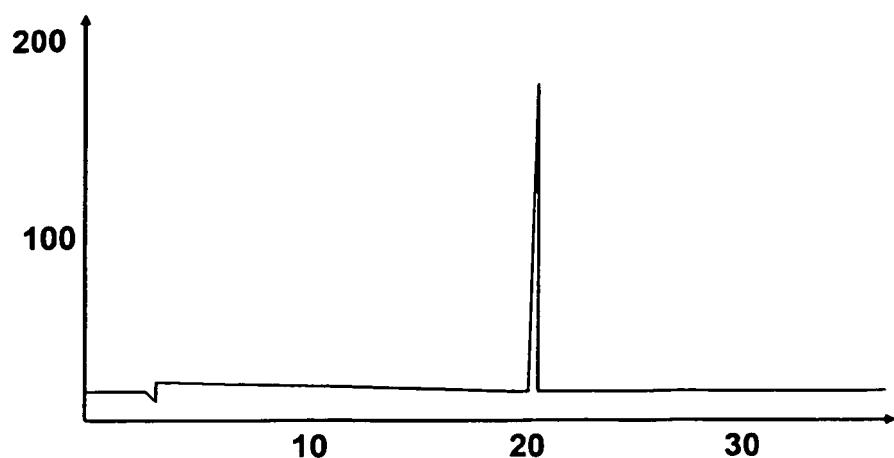


Fig. 1B

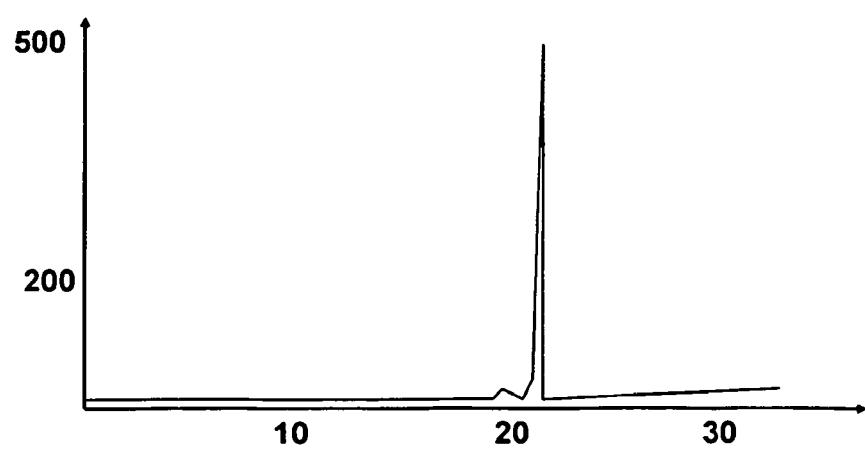


Fig. 2A

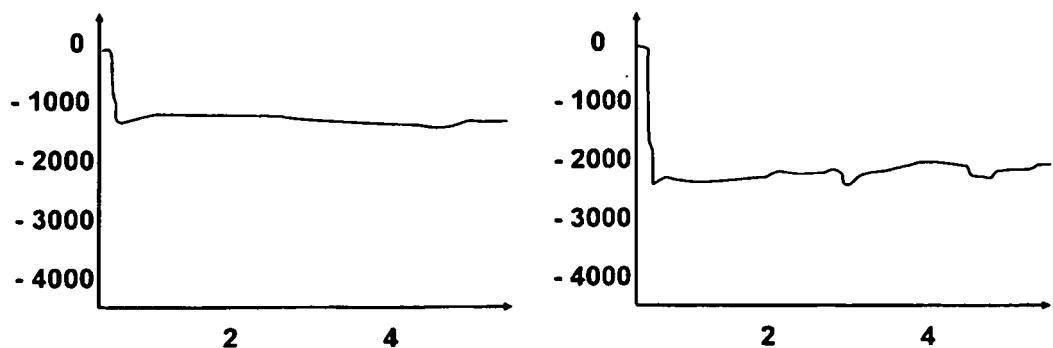


Fig. 2B

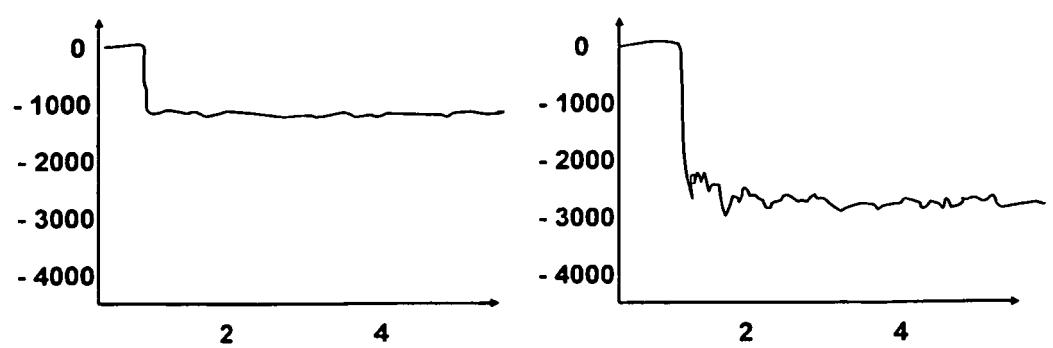


Fig. 3A

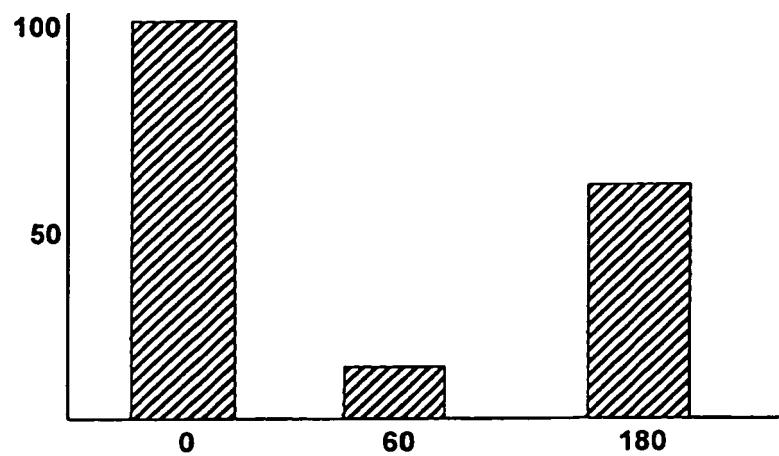
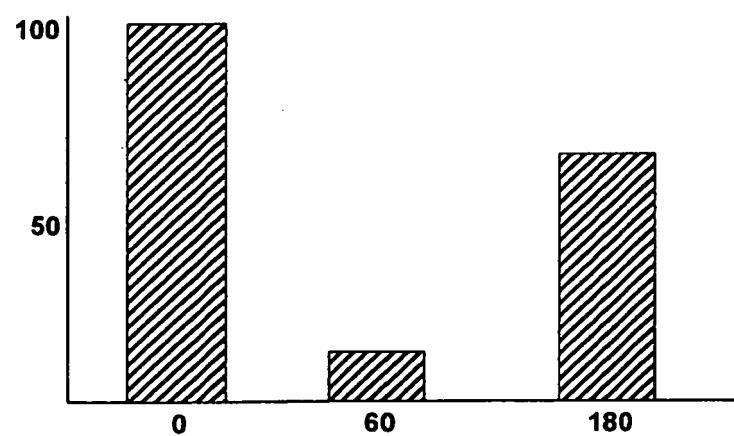


Fig 3B



IN DER BESCHREIBUNG AUFGEFÜHRTE DOKUMENTE

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde ausschließlich zur Information des Lesers aufgenommen und ist nicht Bestandteil des europäischen Patentdokumentes. Sie wurde mit größter Sorgfalt zusammengestellt; das EPA übernimmt jedoch keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

In der Beschreibung aufgeführte Patentdokumente

- DE 3841759 [0007]
- WO 0009149 A [0013] [0014]

In der Beschreibung aufgeführte Nicht-Patentliteratur

- **VON CARSWELL et al.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1975, vol. 72, 3666 [0008]
- **M. R. RUFF et al.** *Lymphokines*. Academic Press Inc, 1981, vol. II, 235-275 [0008]
- **D PENNICA et al.** *Nature*, 1984, vol. 312, 724 [0008]
- **AGGARWAL, B. B. et al.** *J. Biol. Chem.*, 1985, vol. 260, 2334-2345 [0008]
- **NEDWIN, G.E. et al.** *Nucl. Acids Res.*, 1985, vol. 13, 6361 [0008]
- **GOEDDEL D. V. et al.** *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1986, vol. 51, 597 [0010]
- **J.W. LARRICK et al.** *Pharmac. Res.*, 1988, vol. 5 (3), 129-139 [0011]
- **TORTI F. M. et al.** *Science*, 1985, vol. 229, 867-869 [0011]
- **PIGUET, P F et al.** *J. Exp. Med.*, 1987, vol. 166, 1280 [0011]
- **LUCAS R et al.** *Science*, 1994, vol. 263 (5148), 814-817 [0013]
- **HRIBAR M. et al.** *Eur. J. Immunol.*, 1999, vol. 29, 3105-3111 [0013]
- **BRAUN C.** *J. Immunol.*, 2005, vol. 175, 3402-3408 [0013]
- **FUKUDA N. et al.** *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, vol. 280, L1258-L1265 [0013]
- **CLUNES M.T. et al.** *J Physiol*, 15. Juni 2004, vol. 557 (3), 809-819 [0038]
- **ISIK F. et al.** *Eur J Cardiothorac Surg*, 2005, vol. 28, 301-305 [0040]
- **HAMILL et al.** *Pflugers Arch.*, 1981, vol. 391 (2), 85-100 [0064]