



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 366 715**

51 Int. Cl.:
C12N 9/02 (2006.01)
A61K 38/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06820396 .7**
96 Fecha de presentación : **04.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1960515**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.08.2008**

54 Título: **Péptidos antiinflamatorios.**

30 Prioridad: **06.12.2005 GB 0524884**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.10.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.10.2011

73 Titular/es: **The University of Manchester
Oxford Road
Manchester M13 9PL, GB**

72 Inventor/es: **Cumberbatch, Marie;
Dearman, Rebecca, Jane;
Kimber, Ian y
Viner, Russell**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 366 715 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

Péptidos antiinflamatorios

5 La presente invención se refiere, entre otras cosas, a un procedimiento para mejorar una afección cutánea inflamatoria. Se sabe que las afecciones cutáneas inflamatorias están asociadas con una alteración de la expresión de quimiocinas y citocinas y, en particular, con un aumento de la actividad de citocinas proinflamatorias tales como interleucina (IL)-1 α , IL-1 β y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). Se sabe que estas mismas citocinas también juegan papeles fundamentales en el inicio de respuestas inmunes cutáneas, y de hecho proporcionan señales obligatorias para la migración de células de Langerhans (CL) epidérmicas desde la piel. El movimiento de CL desde la epidermis, y su acumulación posterior en ganglios linfáticos que drenan a la piel proporciona un mecanismo para el transporte de antígenos a los sitios (ganglios linfáticos regionales) en los que se inducen las respuestas inmunes primarias.

10 La presente invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que ciertos péptidos derivados de tiorredoxina pueden inhibir la migración de CL epidérmicas – consecuente con una alteración de la expresión de citocinas proinflamatorias – cuando se aplican tópicamente a la piel.

15 De esta manera, de acuerdo con la presente invención se proporciona un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KMIKP, en el que el péptido comprende no más de 10 aminoácidos y en el que el péptido puede inhibir la migración de células de Langerhans inducida por alérgeno.

El péptido de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:-

CGPCKMIKP (SEC ID N^o: 9);

20 AGPAKMIKP (SEC ID N^o: 11); y

KMIKP (SEC ID N^o: 13)

La presente invención proporciona además una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la presente invención. Preferentemente, la composición farmacéutica se selecciona del grupo que consiste en una solución, un gel, una loción, una pomada, una crema y una pasta.

25 La presente invención también se refiere al uso de un péptido de acuerdo con la presente invención como producto farmacéutico.

La afección cutánea inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, liquen plano, eccema atópico, dermatitis de contacto alérgica o irritante, urticaria de contacto, eccema infantil y acné vulgar.

30 La presente invención se refiere además a una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido de la presente invención.

La presente invención se refiere además a un procedimiento para la fabricación del péptido. Cuando es apropiado, el péptido se fabrica por síntesis química usando procedimientos bien conocidos por el experto en la materia. Para péptidos de mayor tamaño, también es posible usar tecnologías de ADN recombinante para proporcionar los péptidos, de nuevo usando procedimientos bien conocidos para el experto en la materia.

35 Lista de Figuras

En todas las figuras, "OX" = oxazolona.

- Figura 1** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de respuesta a la dosis para el péptido 1.
- 40 **Figura 2** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de respuesta a la dosis para el péptido 3.
- Figura 3** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento comparativo de péptido 1 frente a péptido 3.
- Figura 4** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de respuesta a la dosis para el péptido 7.
- 45 **Figura 5** Migración de células de Langerhans epidérmicas – dos preparaciones independientes de péptido 3 (3-1 y 3-2) y péptido RV-1.
- Figura 6** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de respuesta a la dosis para el péptido RV-1.
- Figura 7** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento comparativo que muestra la actividad del péptido 3, péptido RV-1 y el nonúmero (CGPCKMIKP).
- 50 **Figura 8** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de respuesta a la dosis para el nonúmero (CGPCKMIKP).
- Figura 9** Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento para investigar si el péptido

- Figura 10 nonamérico (CGPCKMIKP) afecta a la migración de células de Langerhans inducida por IL-1 β o TNF- α . Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento de control que muestra la actividad del nonúmero (CGPCKMIKP) y un nonúmero “scrambled” (de secuencia alterada) (IPCMPKCKG).
- Figura 11 Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento comparativo que muestra la actividad del nonúmero (CGPCKMIKP) y el péptido KMIMP.
- Figura 12 Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento comparativo que muestra la actividad de la tiorredoxina humana (SEC ID N^o: 14), el péptido nonamérico (CGPCKMIKP), el péptido KMIKP y el péptido CGPC.
- Figura 13 Migración de células de Langerhans epidérmicas – experimento comparativo que muestra la actividad del péptido nonamérico (CGPCKMIKP), un nonúmero “scrambled” sin cisteína (IPAMPKAKG) y el péptido nonamérico sin cisteína (AGPAKMIKP).

Ejemplos

Se sintetizaron químicamente los siguientes péptidos

Péptido 1	VKQIESKTAFQEALDAAGDK (SEC ID N ^o : 1)
Péptido 2	AAGDKLVWDFSATWCGPCK (SEC ID N ^o : 2)
Péptido 3	CGPCKMIKPPFHSLSEKYSN (SEC ID N ^o : 3)
Péptido 4	EKYSNVIFLEVDVDDCQDVA (SEC ID N ^o : 4)
Péptido 5	CQDVASECEVKCMPTFQFFK (SEC ID N ^o : 5)
Péptido 6	FQFFKKGQKVGFEFSGANKEK (SEC ID N ^o : 6)
Péptido 7	ANKEKLEATINELV (SEC ID N ^o : 7)
Péptido RV1	SATYCGPCKMIKP (SEC ID N ^o : 8)
Péptido nonamérico	CGPCKMIKP (SEC ID N ^o : 9)
Nonúmero scrambled	IPCMPKCKG (SEC ID N ^o : 10)
Nonúmero sin cisteína	AGPAKMIKP (SEC ID N ^o : 11)
Nonúmero sin cisteína scrambled	IPAMPKAKG (SEC ID N ^o : 12)
“KMIKP”	KMIPK (SEC ID N ^o : 13)

En algunos de los experimentos también se incluye tiorredoxina humana recombinante (rhTRX) (SEC ID N^o: 14).

**MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVWDFSATWCGPCKMIKPPFHSLSEKYSNV
IFLEVDVDDCQDVASECEVKCMPTFQFFKKGQKVGFEFSGANKEKLEATINEL
V (SEC ID N^o: 14)**

Se realizan diversos estudios titulares para examinar el efecto de cada uno de los polipéptidos mencionados anteriormente sobre la migración de Células de Langerhans (CL) inducida por alérgeno (oxazolona). Las aplicaciones son en μ g a menos que se indique otra cosa.

Experimento 1.

- El objetivo de este experimento es determinar si la aplicación tópica del péptido 1 puede influir en la integridad de la migración de CL inducida por la exposición posterior en el mismo sitio a oxazolona, un potente alérgeno de contacto que se sabe que produce la movilización de CL. En la Figura 1 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Los resultados revelan que la exposición previa al péptido 1 no inhibe la migración de CL inducida por alérgeno.

Experimento 2.

- El objetivo de este experimento es determinar si la aplicación tópica del péptido 3 puede influir en la integridad de la migración de CL inducida por una exposición posterior en el mismo sitio a oxazolona. En la Figura 2 se ilustran los resultados de 3 experimentos independientes. Los resultados revelan que la exposición previa al péptido 3 en todos los casos produce una inhibición completa (o casi completa) de la migración de CL inducida por alérgeno a la mayor concentración (0,5 μ g) ensayada. En dos de los tres experimentos hay alguna indicación de una inhibición relacionada con la dosis de la migración de CL inducida por alérgeno por el péptido 3. La conclusión extraída es que el péptido 3 aplicado tópicamente puede inhibir uno o más procesos biológicos necesarios para la movilización eficaz y la migración de CL en respuesta a un estímulo, en este caso el alérgeno de contacto oxazolona.

Experimento 3.

- El objetivo de este experimento es realizar un análisis comparativo simultáneo del péptido 1 y el péptido 3. Los resultados del experimento se ilustran en la Figura 3 – y confirman los hallazgos de los experimentos previos. Es decir, la exposición previa al péptido 3 produce una inhibición sustancial de la migración de CL inducida por alérgeno, mientras que una exposición previa idéntica al péptido 1 no inhibe la migración de CL inducida por

alérgeno.

Experimento 4.

5 El objetivo de este experimento es determinar si la aplicación tópica del péptido 7 puede influir en la integridad de la migración de CL inducida por una exposición posterior en el mismo sitio a oxazolona. En la Figura 4 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Los resultados revelan que la exposición previa al péptido 7 no inhibe la migración de CL inducida por alérgeno.

Experimento 5.

10 El objetivo de este experimento es determinar si hay alguna variación de actividad entre lotes de síntesis de péptidos (pep3-1 y pep3-2) y también ensayar la actividad del péptido RV-1. En la Figura 5 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Los resultados revelan que la exposición previa al péptido RV-1 no inhibe la migración de CL inducida por alérgeno – y que sólo se observa una pequeña variación de actividad entre los lotes de síntesis de péptido.

Experimento 6.

15 El objetivo de este experimento es examinar la respuesta a la dosis del péptido RV-1. En la Figura 7 se ilustran los resultados de un experimento representativo.

Experimento 7.

El objetivo de este experimento es comparar la actividad del péptido 3, péptido RV-1 y el nonámero (CGPCKMIKP). En la Figura 7 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Estos resultados muestran que todos los péptidos ensayados son activos.

Experimento 8.

El objetivo de este experimento es examinar la respuesta a la dosis del péptido nonamérico (CGPCKMIKP). En la Figura 8 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Los resultados del experimento confirman la actividad del péptido nonamérico a todas las dosis ensayadas.

Experimento 9.

25 El objetivo de este experimento es investigar si el péptido nonamérico (CGPCKMIKP) podría afectar a la migración de células de Langerhans inducida por IL-1 β o TNF- α . En la Figura 9 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Estos resultados revelan que la exposición tópica previa al péptido nonamérico puede producir una inhibición casi completa de la migración de células de Langerhans inducida por la inyección intradérmica (id) de TNF- α homólogo. Por el contrario, el péptido nonamérico aplicado de la misma manera carece de influencia sobre la integridad de la migración de células de Langerhans provocada por la administración id de IL-1 β homóloga. La interpretación es que la administración tópica del péptido nonamérico está asociada con una perturbación de la función de IL-1 β .

Experimento 10.

35 El objetivo de este experimento de control es examinar la actividad del nonámero (CGPCKMIKP) y un nonámero "scrambled" de control (IPCMPKCKG). En la Figura 10 se ilustran los resultados de un experimento representativo. Los resultados muestran que el orden de los aminoácidos en el péptido nonamérico es importante para conservar la actividad biológica – ya que el nonámero scrambled, que comprende los mismos aminoácidos que el nonámero, no es biológicamente activo.

Experimento 11.

40 El objetivo de este experimento es confirmar la actividad del nonámero (CGPCKMIKP) y examinar la actividad del péptido KMIMP – que, según se muestra, es activo. En la Figura 11 se ilustran los resultados de un experimento representativo.

Experimento 12.

45 El objetivo de este experimento comparativo es mostrar la actividad de la tiorredoxina humana recombinante (hTRX) (SEC ID N^o: 14), de la que derivan los péptidos de la presente invención, el péptido nonamérico (CGPCKMIKP), el péptido KMIMP y el péptido CGPC. Todos los péptidos se aplicaron en dosis equimolares (1,38 μ M) – lo cual equivale a 0,5 μ g de hTRX, 0,04 μ g del péptido nonamérico, 0,025 μ g del péptido KMIMP y 0,016 μ g del péptido CGPC. En la Figura 12 se ilustran los resultados de un experimento representativo – en el que puede verse que todos excepto el péptido CGPC parecen presentar actividad biológica.

50

Experimento 13.

El objetivo de este experimento es comparar la actividad del péptido nonamérico (CGPCKMIKP), un nonúmero "scrambled" sin cisteína de control (IPCMPKCKG) y el péptido nonamérico sin cisteína (AGPAKMIKP). En la Figura 13 se ilustran los resultados de un experimento representativo – donde puede verse que el péptido nonamérico (CGPCKMIKP) y el péptido nonamérico sin cisteína (AGPAKMIKP) son activos mientras que el nonúmero "scrambled" sin cisteína de control no lo es.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <210> 1
- <211> 20
- 10 <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido Sintético
- <400> 1

Val	Lys	Gln	Ile	Glu	Ser	Lys	Thr	Ala	Phe	Gln	Glu	Ala	Leu	Asp	Ala
1				5					10					15	
	Ala	Gly	Asp	Lys											
				20											

- 15 <210> 2
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial
- 20 <220>
- <223> Péptido Sintético
- <400> 2

Ala	Ala	Gly	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Val	Asp	Phe	Ser	Ala	Thr	Trp	Cys
1				5					10					15	
	Gly	Pro	Cys	Lys											
				20											

- <210> 3
- 25 <211> 20
- <212> PRT
- <213> Artificial
- <220>
- <223> Péptido Sintético
- 30 <400> 3

Cys	Gly	Pro	Cys	Lys	Met	Ile	Lys	Pro	Phe	Phe	His	Ser	Leu	Ser	Glu
1				5					10					15	
	Lys	Tyr	Ser	Asn											
				20											

- <210> 4

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

5 <223> Péptido Sintético

<400> 4

Glu Lys Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys
1 5 10 15
Gln Asp Val Ala
20

<210> 5

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 5

Cys Gln Asp Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe
1 5 10 15
Gln Phe Phe Lys
20

15

<210> 6

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial

20 <220>

<223> Péptido Sintético

<400> 6

Phe Gln Phe Phe Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala
1 5 10 15
Asn Lys Glu Lys
20

<210> 7

25 <211> 14

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 7

Ala Asn Lys Glu Lys Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
1 5 10

<210> 8

<211> 13

5 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 8

Ser Ala Thr Tyr Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro
1 5 10

10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

15 <220>

<223> Péptido Sintético

<400> 9

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro
1 5

<210> 10

20 <211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

25 <400> 10

Ile Pro Cys Met Pro Lys Cys Lys Gly
1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 11

Ala Gly Pro Ala Lys Met Ile Lys Pro
1 5

5 <210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

10 <223> Péptido Sintético

<400> 12

Ile Pro Ala Met Pro Lys Ala Lys Gly
1 5

<210> 13

<211> 5

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 13

Lys Met Ile Pro Lys
1 5

20

<210> 14

<211> 105

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 14


```

Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
1           5           10           15
Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
20           25           30
Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
35           40           45
Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
50           55           60
Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
65           70           75           80
Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
85           90           95
Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
100           105

```

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 15

```

Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys Tyr Ser Asn
1           5           10           15

```

10 <210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido Sintético

<400> 16

```

Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu
1           5           10           15

```

<210> 17

<211> 20

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 17

Ala Gly Pro Ala Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu
 1 5 10 15
 Lys Tyr Ser Asn
 20

<210> 18

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> Péptido Sintético

<400> 18

Ser Ala Thr Tyr Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro
 1 5 10

10 <210> 19

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> Péptido Sintético

<400> 19

Trp Cys Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KMIKP, en el que el péptido consiste en no más de 10 aminoácidos y en el que el péptido es capaz de inhibir la migración de células de Langerhans inducida por alérgeno, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 9; SEC ID N°: 11; y SEC ID N°: 13.
2. Una composición farmacéutica que comprende un péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
3. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la composición se selecciona del grupo que consiste en una solución, un gel, una loción, una pomada, una crema y una pasta.
4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 1, para uso como un producto farmacéutico.
5. Uso de un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos KMIKP, en el que el péptido consiste en no más de 10 aminoácidos, y en el que el péptido es capaz de inhibir la migración de células de Langerhans inducida por alérgeno, en el que el péptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en la SEC ID N°: 9; SEC ID N°: 11; y SEC ID N°: 13, en la fabricación de un medicamento tópico para el tratamiento de una afección cutánea inflamatoria.
6. Uso de acuerdo con la reivindicación 5, en el que dicha afección cutánea inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en psoriasis, liquen plano, eccema atópico, dermatitis de contacto alérgica o irritante, urticaria de contacto, eccema infantil y acné vulgar.

Figura 1

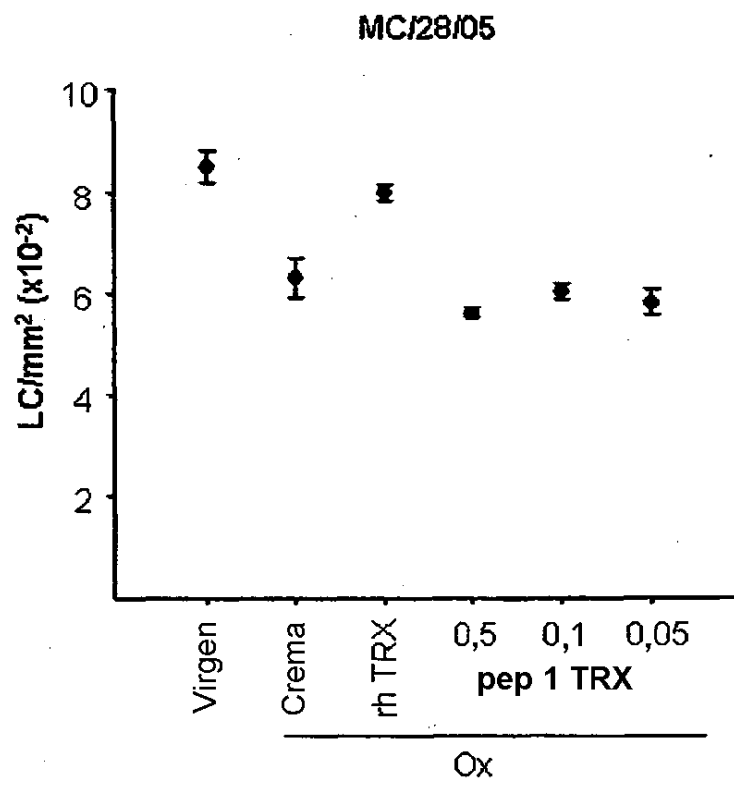


Figura 2

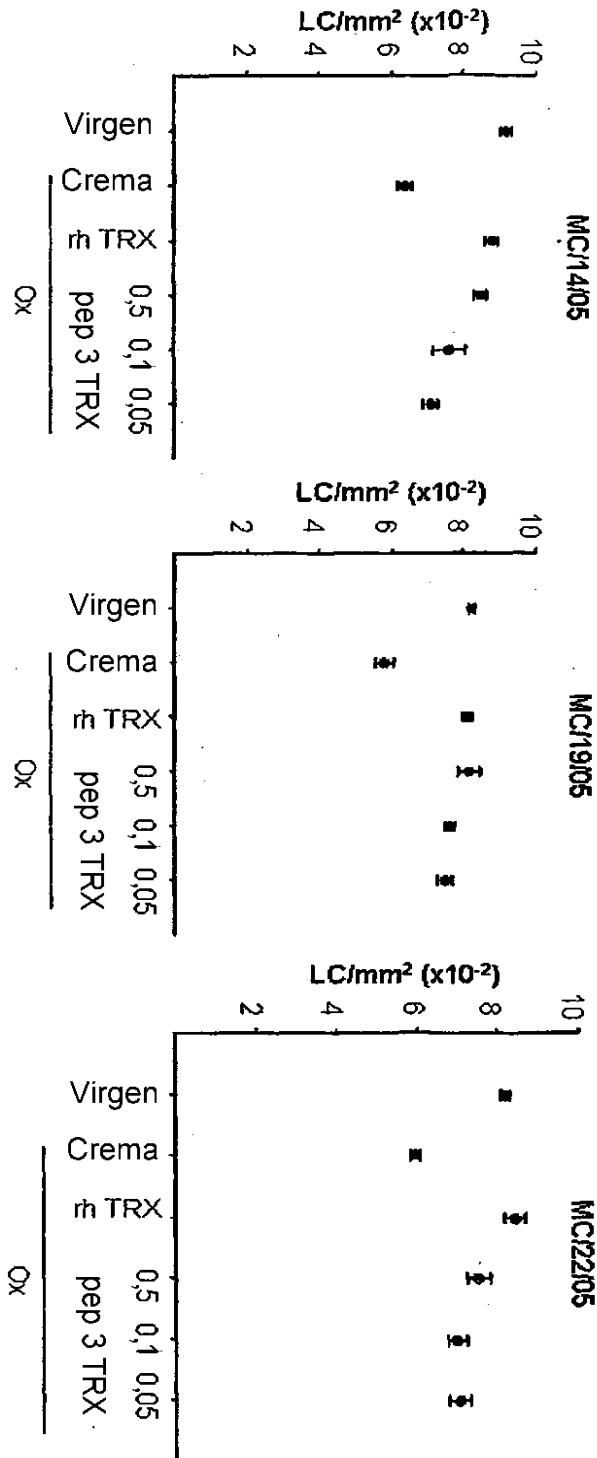


Figura 3

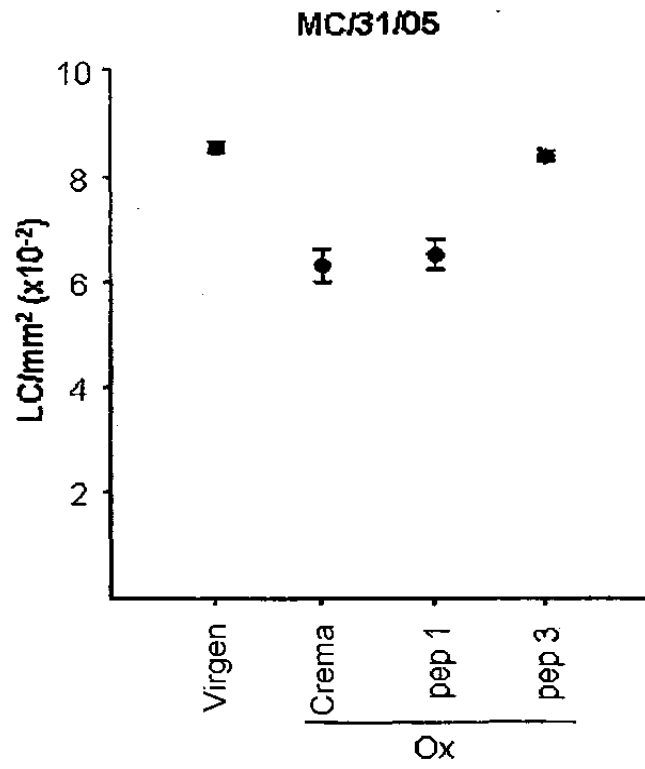


Figura 4

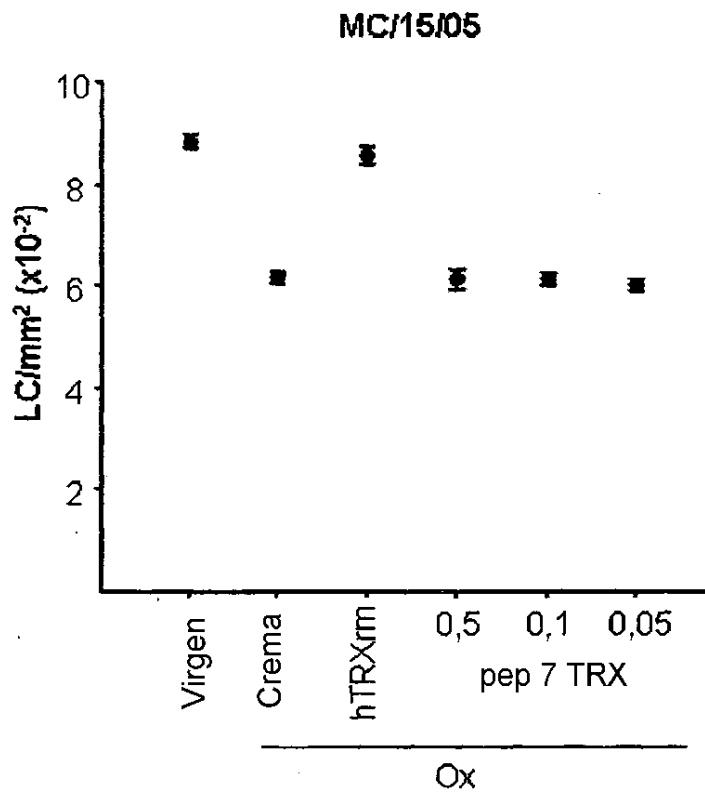


Figura 5

Péptido 3 de TRX (3-1 y 3-2) frente a RV-1

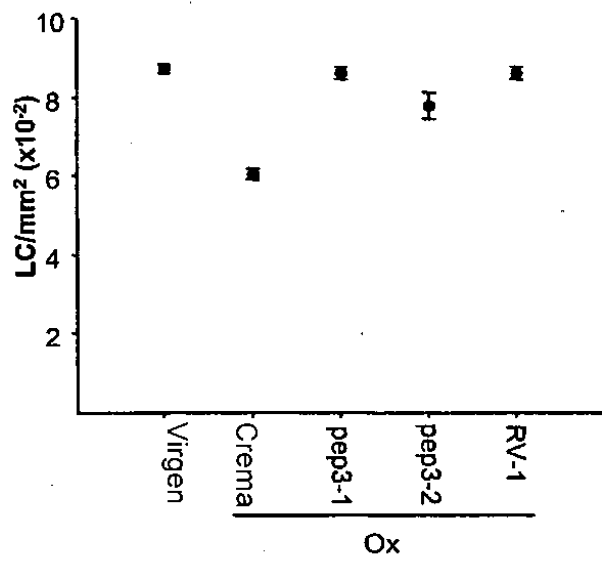


Figura 6

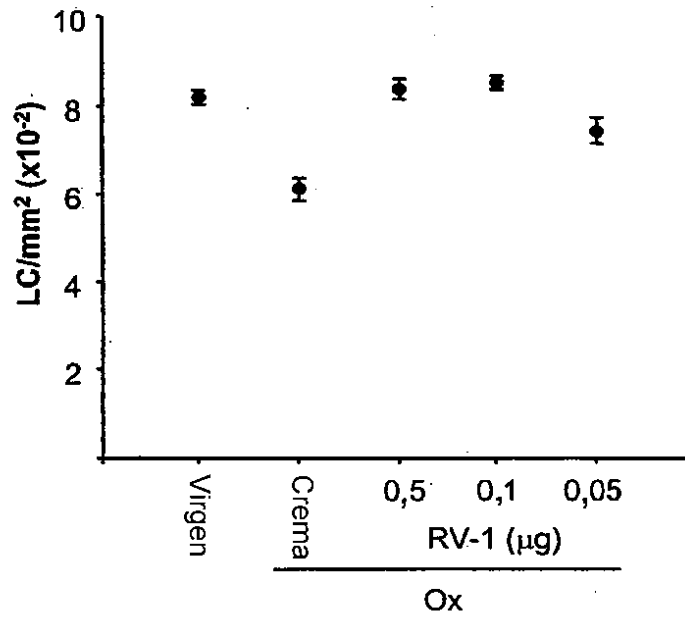


Figura 7

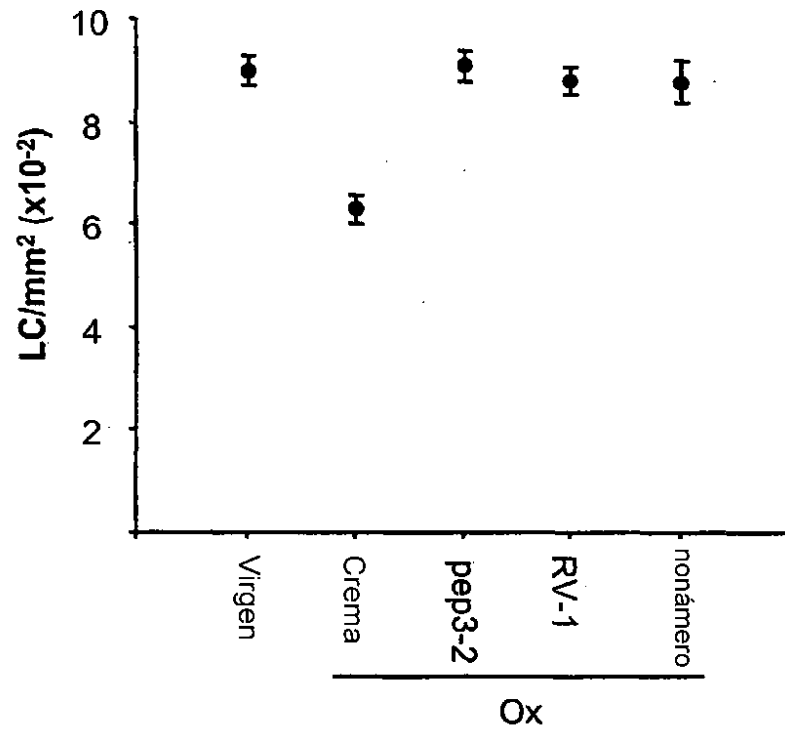


Figura 8

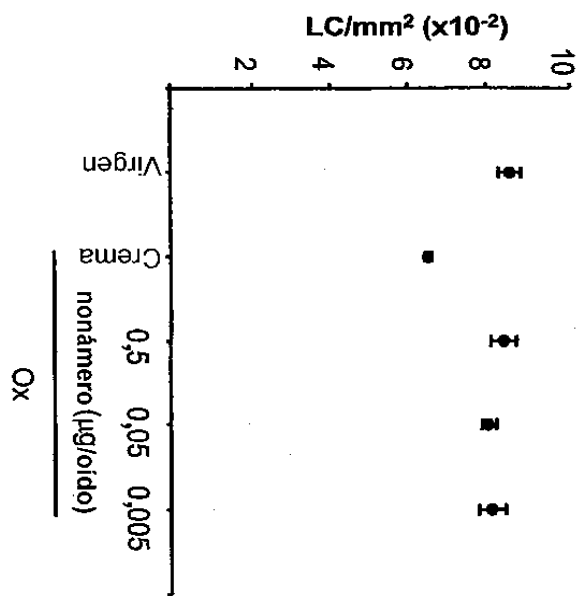
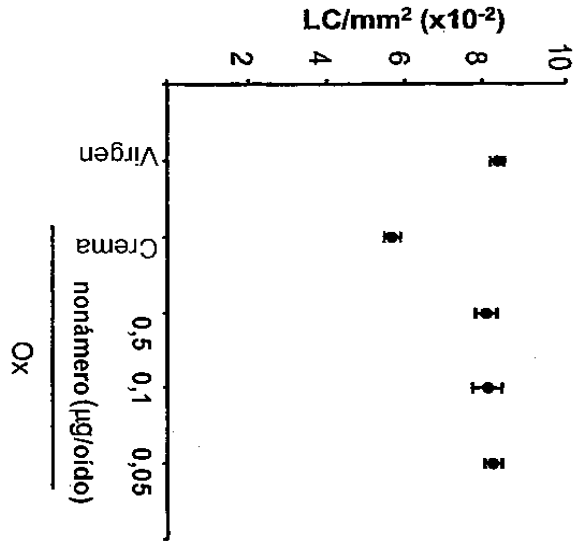


Figura 9

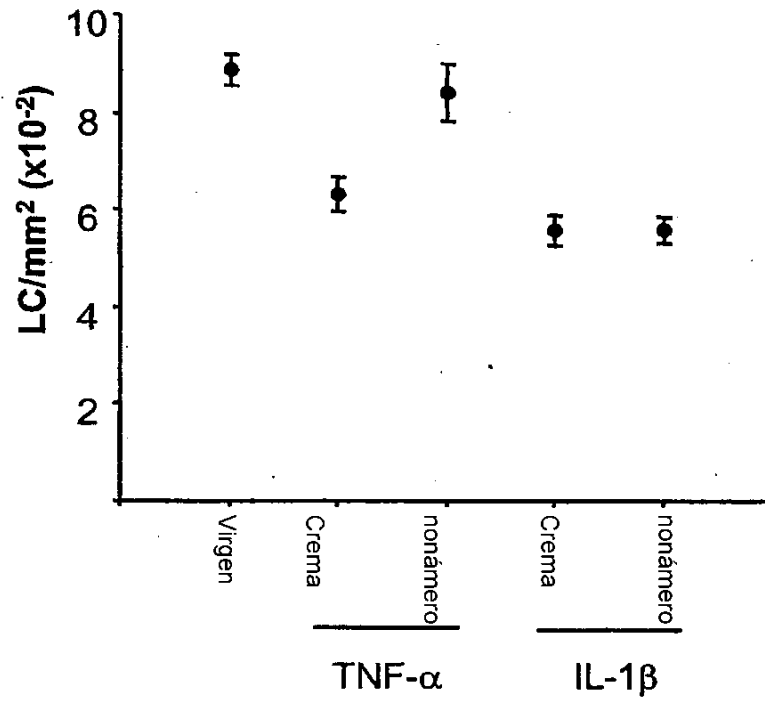


Figura 10

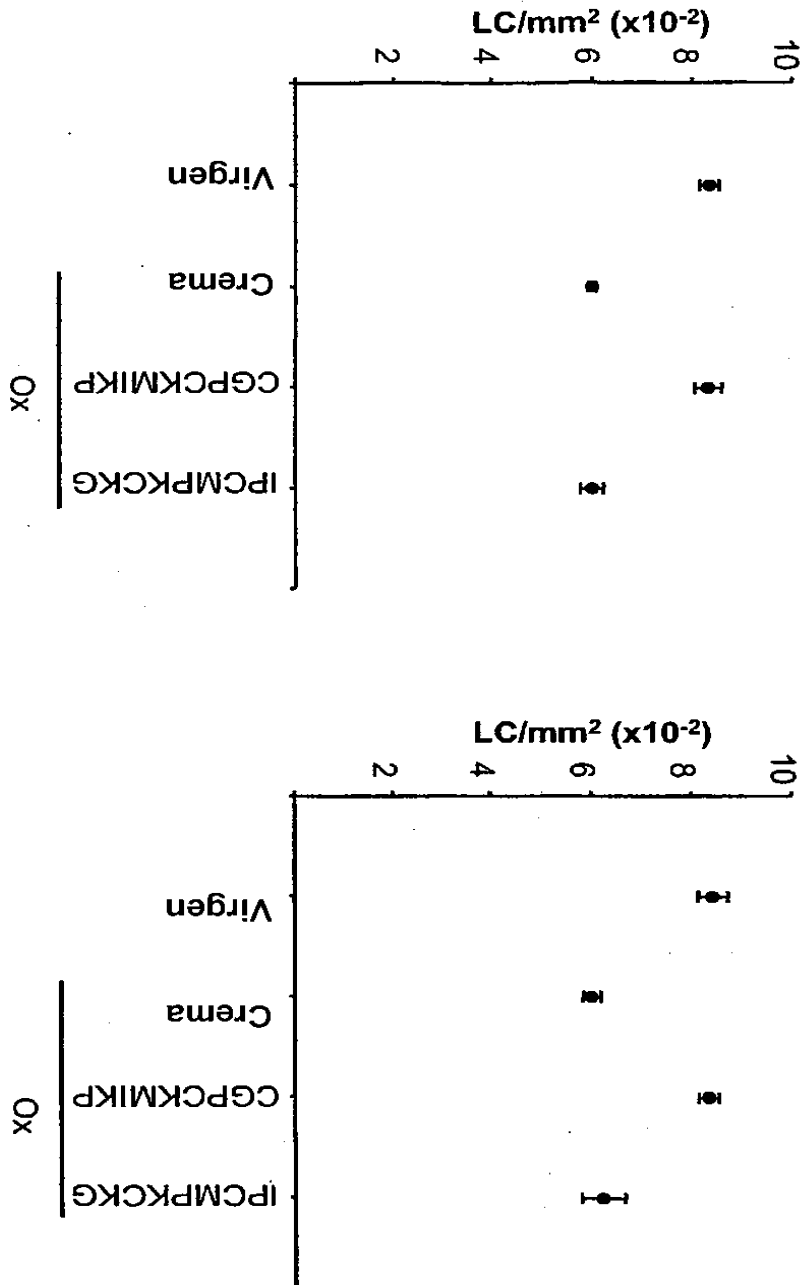


Figura 11

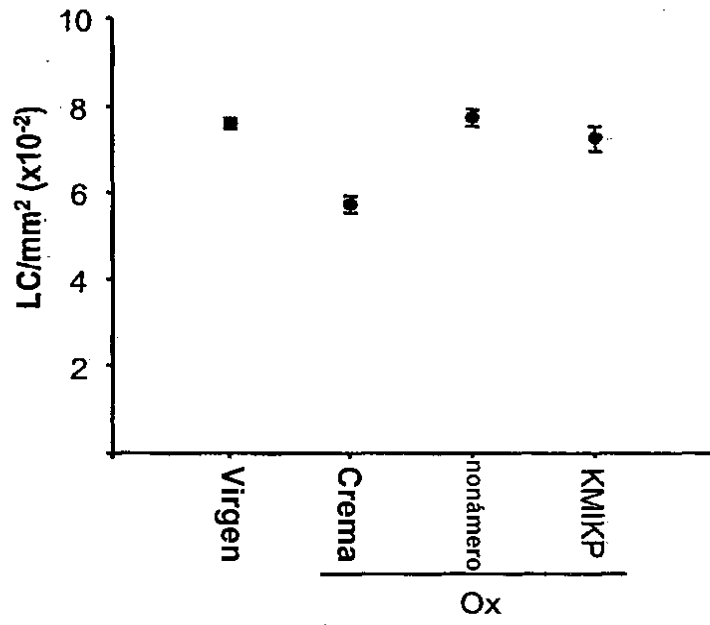


Figura 12

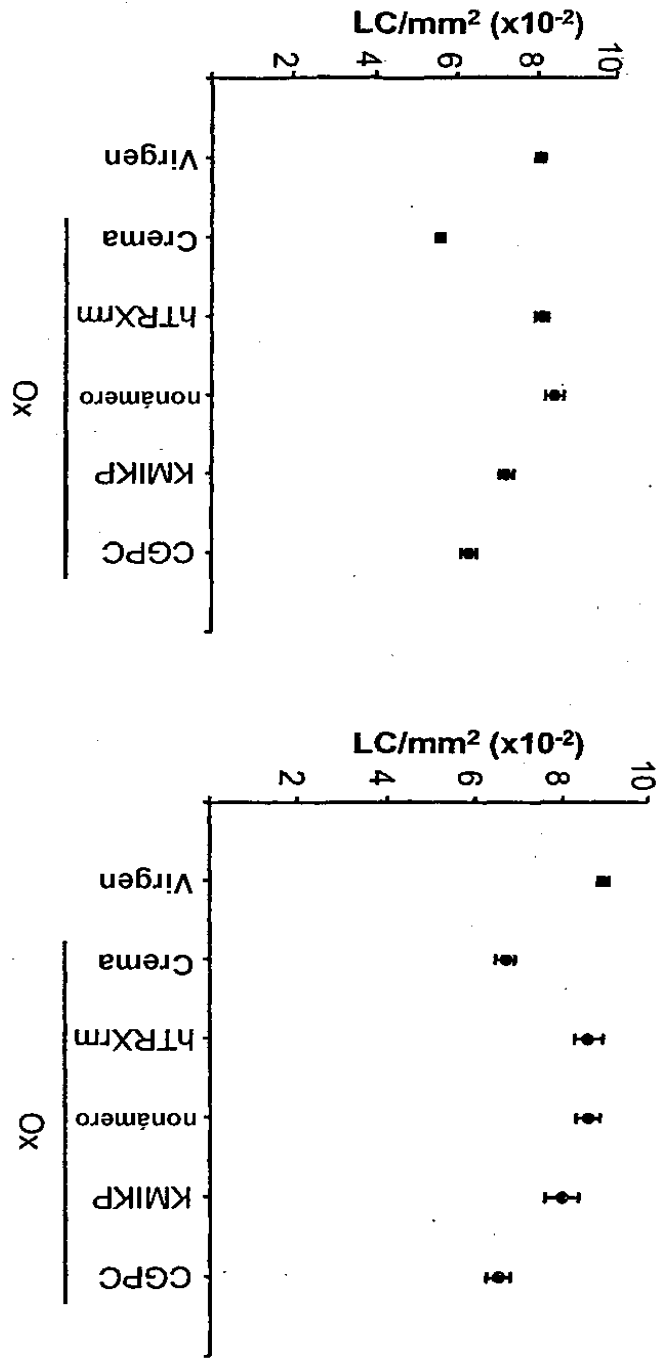


Figura 13

