(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 382 289**

(21) Número de solicitud: 201031673

(51) Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

(12) SOLICITUD DE PATENTE A1

(22) Fecha de presentación: **12.11.2010**

(43) Fecha de publicación de la solicitud: **07.06.2012**

(43) Fecha de publicación del folleto de la solicitud: **07.06.2012**

(71) Solicitante/s: **Universidad Autónoma de Madrid**
c/ Einstein, 3
28049 Madrid, ES

(72) Inventor/es: **Mayor Menéndez, Federico;**
Murga Montesinos, Cristina;
Campos Muelas, Pedro Manuel;
Johanna Heijnen, Jacoba;
Antonius Kavelaars, Anna Maria Agnes y
Morreale de León, Antonio

(74) Agente/Representante:
Arias Sanz, Juan

(54) Título: **Péptido inhibidor de p38 y aplicaciones.**

(57) Resumen:
Péptido inhibidor de p38 y aplicaciones.
Se describe un péptido con capacidad para inhibir la activación o la actividad biológica de la proteín kinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 y su empleo en el tratamiento de una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad que cursa con dolor.

ES 2 382 289 A1

DESCRIPCIÓN

Péptido inhibidor de p38 y aplicaciones.

Campo de la invención

La presente invención se relaciona, en general, con un método para inhibir la activación o la actividad biológica de la proteín kinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 y con un método para tratar un sujeto que padece una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38 con un péptido. La invención también se relaciona con dicho péptido, con composiciones farmacéuticas que comprenden dicho péptido y con sus aplicaciones.

Antecedentes de la invención

La proteína p38 es una kinasa miembro de una familia de moléculas señalizadores conocida como la familia de las proteín kinasas activadas por mitógenos (MAPK), una familia de Ser/Thr kinasas responsables de numerosos procesos celulares tales como el crecimiento celular, proliferación, muerte celular y diferenciación en respuesta a un amplio espectro de estímulos. Otros miembros de dicha familia incluyen las kinasas c-Jun N-terminal (JNKs) y las kinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs). La subfamilia de p38 responde a numerosos estímulos de estrés, por ejemplo, luz ultravioleta, shock osmótico, calor, y citoquinas inflamatorias tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) y la interleuquina 1 beta (IL-1β).

Se conocen cuatro isoformas de la MAPK p38 identificadas como p38α, p38β2, p38γ y p38δ, que difieren en sus perfiles de expresión en tejidos (p38α y p38β2 se expresan en casi todos los tejidos, p38γ se expresa principalmente en músculo y p38δ en pulmón y riñón), utilización de sustratos, respuesta a estímulos directos e indirectos, y susceptibilidad a inhibidores de kinasas. Aunque p38α es la isoforma más estudiada y, aparentemente, la más relevante fisiológicamente, todas las isoformas presentan un alto grado de identidad de secuencia: más del 70% entre p38α y p38β2 y alrededor del 60% entre las isoformas p38γ y p38δ respecto a p38α.

La MAPK p38 se activa mediante fosforilación en la secuencia consenso TGY (Thr-Gly-Tyr), por acción de sus kinasas activadoras MAPK kinasa (MAPKK o MKK), principalmente MKK3/3b y MKK6, y, en menor grado, MKK4. Bajo condiciones fisiológicas, la activación de la MAPK p38 parece ser transitoria. Una vez activada, la MAPK p38 media la estabilización de ARN mensajeros (ARNm) para diversos mediadores inflamatorios, incluyendo TNF-α, IL-1β, interleuquina 6 (IL-6), y ciclooxigenasa 2 (COX-2)).

La MAPK p38 parece desempeñar un papel importante en procesos muy diversos, tales como en inflamación, en diferenciación celular (por ejemplo, en la conversión de mioblastos a miotubos, en la diferenciación de células preadipocíticas, en la diferenciación de timocitos, etc.), en la regulación de la migración celular en respuesta a diversos estímulos (por ejemplo, la migración de células endoteliales estimulada por el factor de crecimiento endotelial (VEGF), etc.), y en el ciclo celular (en donde la vía de p38-MK2 regula el "checkpoint" G2/M en respuesta a luz ultravioleta o los "checkpoint" G0 y G1/S).

La disfunción de la ruta de la MAPK p38 se ha correlacionado con la etiología y/o el desarrollo de diversas patologías, entre las que se encuentran la artritis reumatoide, psoriasis, fallo cardíaco, diabetes e incluso Alzheimer. Por tanto, la MAPK p38 se ha convertido en una importante diana terapéutica. A modo ilustrativo, se ha descrito el empleo de diversos inhibidores de la MAPK p38 en el tratamiento de enfermedades respiratorias (EP 1534282), enfermedades autoinmunes tales como artritis reumatoide, psoriasis o enfermedad de Crohn (WO 2004/014387), dolor (WO 2004/021988) o enfermedades cardiovasculares (WO 2005/032551). B. Kamiska [Kamiska B., Biochimica et Biophysica Acta. 1754 (2005):253-262], en una revisión general de inhibidores de la MAPK p38 de naturaleza no peptídica y sus efectos en inflamación describe el efecto inhibidor de la MAPK p38 del compuesto SB 203580 [4-[4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-1*H*-imidazol-5-il]piridina], potencialmente útil como agente anti-inflamatorio en el tratamiento de la artritis reumatoide.

Asimismo, se han descrito compuestos de naturaleza peptídica con capacidad de unión a la MAPK p38. Entre dichos compuestos se encuentran los péptidos identificados como pepMKK3b [SKGKSKRKKDLRISCNSK], sintetizado a partir de la secuencia de MKK3b, y pepMEF2A [RKPDLRVVIPPS], sintetizado a partir de la secuencia de MEF2A [Chang Ch *et al*. Molecular Cell. 9:1241-1249, June 2002], así como el péptido de fusión TAT-MKK3b [YGRKKRRQRRRGKGKSKRKKDLRI], que comprende parte del péptido pepMKK3b fusionado a una secuencia de permeabilización transmembrana, un inhibidor de p38 con un efecto anti-inflamatorio *in vitro* e *in* [Fu J. *et al*. Medical Chemistry, 2008. 4:597-604], No obstante, la capacidad del péptido pepMEF2A de inhibir la activación y la actividad biológica de la MAPK p38 *in vitro* es muy baja lo que dificulta su eventual empleo como fármaco. Si bien el péptido TAT-MKK3b descrito representa una buena prueba de concepto de que los péptidos que se unen al dominio de anclaje de p38 pueden inhibir la ruta de señalización intracelular de esta quinasa, la eficacia de este primer abordaje ha sido sólo relativa ya que tanto la longitud del péptido (24 aas) como las dosis a las que se debe emplear para resultar eficaz son manifiestamente mejorables, como los propios autores del trabajo reconocen.

Aunque se han descrito inhibidores de la MAPK p38, sigue existiendo la necesidad de identificar nuevos compuestos inhibidores de dicha kinasa, potencialmente útiles en terapia humana, con el fin de incrementar el arsenal

de remedios terapéuticos frente a enfermedades mediadas por la MAPK p38 que pueden ser aliviadas mediante la inhibición de la actividad biológica de dicha MAPK p38.

Compendio de la invención

La invención se relaciona con un péptido, cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1, con capacidad para inhibir la MAPK p38. Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que el péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2 [KPDLRVVICP] no solo reduce la activación y actividad biológica de dicha MAPK p38 así como la secreción de citoquinas dependiente de la MAPK p38 sino que, además, reduce la hiperalgesia inducida por inflamación en un modelo animal, a niveles similares pero de manera más permanente que otros inhibidores establecidos de la MAPK p38, por lo que dicho péptido inhibidor de la MAPK p38 puede ser potencialmente utilizado no sólo en el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios sino también en el tratamiento del dolor.

Por tanto, en un aspecto, la invención se relaciona con un péptido inhibidor de la activación o actividad biológica de la MAPK p38 cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. En una realización particular, dicho péptido es un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión que comprende dicho péptido proporcionado por esta invención y un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica que comprende, al menos, dicho péptido o proteína de fusión proporcionados por esta invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho péptido inhibidor de la activación o actividad biológica de la MAPK p38, o de dicha proteína de fusión, en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38; o, alternativamente, con dicho péptido inhibidor de la activación o actividad biológica de la MAPK p38, o dicha proteína de fusión, para su empleo en el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38. Entre dichas enfermedades que pueden ser aliviadas mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de la MAPK p38 se encuentran enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades autoinmunes; enfermedades cardíacas; cáncer; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades metabólicas incluyendo diabetes; y enfermedades que cursan con dolor.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un ácido nucleico que codifica dicho péptido o proteína de fusión proporcionados por esta invención. Las construcciones génicas, vectores y células hospedadoras que comprenden dicho ácido nucleico constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir dicho péptido o proteína de fusión proporcionados por esta invención que comprende crecer dicha célula hospedadora que comprende dicho ácido nucleico que codifica dicho péptido o proteína de fusión proporcionados por esta invención bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido, o dicha proteína de fusión, y, si se desea, recuperar dicho péptido o proteína de fusión.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho ácido nucleico o dicha una construcción génica que lo contiene, en la elaboración de vectores y células para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de las estructuras de los complejos de la MAPK p38 con las proteínas MKK3 y MEF2A [Chang CI *et al*., 2002. Mol Cell. Vol 9, 1241-49], y con MK2 [White A, *et al*., Proc Natl Acad Sci USA. 2007 Apr 10; 104(15):6353-8].

La Figura 2 es una representación esquemática de las interacciones establecidas entre un péptido derivado de MEF2A co-cristalizado junto a la MAPK p38 según los datos obtenidos de Chang *et al*. (Coordenadas PDB: 1LEW) [Chang CI *et al*, 2002. Mol Cell. Vol 9, 1241-49], Se representa el péptido en forma de barras (rojo y azul) y la MAPK p38 en un modelo de rellenado espacial (verde). Se especifican los péptidos cristalizados [MEF2A long (SEQ ID NO: 3)], o probados en ensayos de fosforilación de MAPK p38 [MEF2A short (SEQ ID NO: 4), MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2), MEF2A scrambled (SEQ ID NO: 6) y MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8)].

La Figura 3 muestra los resultados de la cuantificación del efecto de péptidos derivados de MEF2A sobre la fosforilación de la MAPK p38 por MKK6 *in vitro*. La fosforilación *in vitro* de la MAPK p38 recombinante por MKK6 purificada se realizó en presencia del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) o de péptidos derivados de la secuencia cristalizada de la proteína MEF2A. Tras la reacción de fosforilación *in vitro* se cuantificó la cantidad de MAPK p38 fosforilada en el bucle de activación (TGY) mediante Western blot con anticuerpos anti fosfo-T180-Y182-p38

(Figura 3 A). La Figura 3B es una gráfica en la que se recoge la cuantificación de los resultados de la inhibición de la activación *in vitro* de la MAPK p38 debido a dichos péptidos, normalizados con los valores obtenidos con un péptido control [“scrmbld” o L-MEF2A scrambled]. La concentración inhibitoria media (IC_{50}) para este efecto inhibidor *in vitro* obtenida en cada caso se muestra en la Figura 3C.

La Figura 4 es una gráfica que muestra la cuantificación de la inhibición de la fosforilación *in vitro* de la MAPK p38 por el péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en presencia o ausencia de un agente reductor [ditiotreitol (DTT)] (Figura 4A). Se determinó la presencia de MAPK p38 fosforilada mediante Western Blot con anticuerpos anti fosfo-T180-Y182-p38 (Figura 4B).

La Figura 5 muestra el efecto del péptido L-MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) unido, por su extremo amino, al péptido transportador TAT (SEQ ID NO: 7) sobre la activación de MAPK p38, MK2 y Hsp27 en respuesta a LPS en una línea celular de monocitos humanos (THP1). Células THP1 fueron estimuladas con lipopolisacárido (LPS) bacteriano en ausencia o presencia del péptido L-MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2). Las células se lisaron y sus proteínas se analizaron por Western Blot con anticuerpos específicos (Figura 5A). La activación de MAPK p38, MK2 y Hsp27 se analizó cuantificando la cantidad de proteína fosforilada por densitometría y normalizando los valores con los obtenidos para los niveles de la MAPK p38 total en cada lisado (Figura 5B). Se utilizaron controles positivos (C+) en ausencia de péptido, y negativos (C-) en ausencia de péptidos y LPS; además, se realizó un control adicional con el péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) (scrbl) a la máxima concentración del péptido (10 μM).

La Figura 6 muestra el efecto del péptido L-MEF2AxCys [péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] y del péptido D-MEF2AxCys [péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en el que los aminoácidos tienen la configuración D], cada uno de ellos, independientemente, unido al péptido transportador TAT (SEQ ID NO: 7), sobre la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacteriano y la supervivencia en monocitos THP-1. Monocitos humanos THP-1 fueron estimulados con LPS bacteriano en presencia del péptido L-MEF2AxCys o D-MEF2AxCys disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) o las cantidades equivalentes de péptidos control con secuencias que contenían los mismos aminoácidos pero en secuencia desordenada (“scrambled”): “L-MEF2A scrambled” [péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] o “D-MEF2AxCys scrambled” [péptido MEF2A (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración D], cada uno de ellos, independientemente, unido al péptido transportador TAT (SEQ ID NO: 7), y también disueltos en DMSO a las concentraciones indicadas en el eje de ordenadas. La cantidad de TNF-α secretado al medio en respuesta a LPS se cuantificó mediante un ensayo de ELISA. La viabilidad celular se cuantificó mediante citometría de flujo (FACS) tras tinción de las células tratadas con ioduro de propidio y cuantificación de la cantidad de células positivas para esa tinción.

La Figura 7 muestra el efecto del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) sobre la hiperalgesia inducida en ratones BL6-GRK2+/- mediante inyección intraplantar de carragenano. A los 7 días post inducción de la hiperalgesia, se determinó el tiempo de latencia de la retirada de la pata en contacto con el calor como indicativo de dolor de tipo inflamatorio a tiempo 0. Después, se les inyectó por vía intratecal bien el inhibidor de MAPK p38 SB23 9063 o bien los péptidos: L-MEF2AxCys scrambled [péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] o L-MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) (2 μg), cada uno de ellos, independientemente, unido al péptido transportador TAT (SEQ ID NO: 7), y se midieron, a los tiempos indicados en el eje de ordenadas, los períodos de latencia de la retirada de la pata que se representan en el eje y.

La Figura 8 muestra el efecto del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) sobre la hiperalgesia inducida en ratones BL6-GRK2+/- mediante inyección intraplantar de carragenano. A los 7 días post inducción de la hiperalgesia, se determinó el tiempo de latencia de la retirada de la pata en contacto con el calor como indicativo de dolor de tipo inflamatorio a tiempo 0. Después, se les inyectó por vía intratecal bien el inhibidor de MAPK p38 SB23 9063 o bien los péptidos: L-MEF2AxCys scrambled [péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] o L-MEF2AxCys (10 μg), cada uno de ellos, independientemente, unido al péptido transportador TAT (SEQ ID NO: 7), y se midieron, a los tiempos indicados en el eje de ordenadas, los períodos de latencia de la retirada de la pata que se representan en el eje y.

Descripción detallada de la invención

Péptido de la invención

En un aspecto, la invención se relaciona con un péptido, en adelante “péptido de la invención”, cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1:

Xaa1-Pro-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Cys-Pro

en donde

Xaa1 es Arg o Lys;

Xaa2 es Asp o Glu;

Xaa3 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa4 es Arg o Lys;

Xaa5 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa6 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa7 es Ile, Leu, Met o Val;

Cys es cisteína; y

Pro es prolina; o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

El péptido de la invención tiene la capacidad de inhibir la activación de la MAPK p38; asimismo, en una realización particular, el péptido de la invención tiene la capacidad de inhibir la actividad biológica de dicha MAPK p38.En una realización particular, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1. En otra realización particular, el péptido de la invención está constituido por la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1.

En una realización particular, Xaa1 es Arg o Lys, preferentemente, Lys.

En otra realización particular, Xaa2 es Asp o Glu, preferentemente, Asp.

En otra realización particular, Xaa3 es Ile, Leu, Met o Val, preferentemente, Leu.

En otra realización particular, Xaa4 es Arg o Lys, preferentemente, Arg.

En otra realización particular, Xaa5 es Ile, Leu, Met o Val, preferentemente, Val.

En otra realización particular, Xaa6 es Ile, Leu, Met o Val, preferentemente, Val.

En otra realización particular, Xaa7 es Ile, Leu, Met o Val, preferentemente, Ile.

En una realización particular y preferida, el péptido de la invención comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [KPDLRVVICP]; dicho péptido es un potente inhibidor de la activación y actividad biológica de la MAPK p38 (Ejemplos 1 y 2).

El término “péptido”, tal como aquí se utiliza, se refiere a un polímero formado por la unión, en un orden definido, de alfa-aminoácidos mediante un enlace peptídico, e incluye modificaciones o derivados del mismo, por ejemplo, glicosilación, fosforilación, acetilación, amidación, etc. Los aminoácidos del péptido de la invención, en función de la orientación del grupo amino que lleva el átomo de carbono alfa, pueden pertenecer a la serie L o a la serie D, preferentemente, a la serie L.

Dentro del alcance de esta invención se encuentran las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención. El término “sales farmacéuticamente aceptables”, tal como aquí se emplea, incluye las sales habitualmente utilizadas para formar sales metálicas o sales de adición de ácidos. La naturaleza de la sal no es crítica siempre y cuando sea farmacéuticamente aceptable. Las sales farmacéuticamente aceptables del péptido de la invención pueden obtenerse a partir de ácidos o bases, orgánicos o inorgánicos. Dichas sales pueden obtenerse por métodos convencionales bien conocidos por los técnicos en la materia.

El péptido de la invención es un inhibidor de la activación o actividad biológica de la MAPK p38, es decir, un compuesto que inhibe la actividad biológica de la MAPK p38. Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que el péptido de la invención actúa directamente sobre la MAPK p38, uniéndose a dicha kinasa, lo que impide su fosforilación (activación) y, por tanto, inhibiendo su actividad biológica (Ejemplo 2). Esta hipótesis se basa en que el efecto inhibidor que el péptido de la invención ejerce sobre la fosforilación de la MAPK p38 por MKK6 *in vitro* fue observado en un ensayo en el que únicamente se utilizaron proteínas (MAPK p38, MKK6 y el péptido de la invención) purificadas y, por tanto, en ausencia de cualquier otra proteína o componente celular que pudiera estar mediando ese efecto de modo indirecto (Ejemplo 1).

Sorprendentemente, la capacidad inhibitoria de un péptido de la invención, en concreto del péptido cuya secuencia de aminoácidos se muestra en la SEQ ID NO: 2, para inhibir la activación de la MAPK p38 *in vitro* (IC_{50} = 5 μM) es considerablemente más alta que la capacidad del péptido MEF2A short [KPDLRVRIPP] (SEQ ID NO: 5) para inhibir la activación de la MAPK p38 *in vitro* (CI_{50} > 1000 μM) (Ejemplo 1) a pesar de que ambos péptidos (decapéptidos) únicamente se diferencian en el aminoácido presente en la posición 9, concretamente, una cisteína (C) en el péptido

de la invención y una prolina (P) en el péptido MEF2A short (SEQ ID NO: 4). Aunque no se desea estar vinculado por ninguna teoría, se cree que el efecto inhibidor del péptido de la invención, por ejemplo, del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2), puede ser debido, entre otros factores, a la presencia de una cisteína en el péptido de la invención, efecto que no se observa en otros péptidos con secuencias aminoacídicas similares pero que carecen de cisteína (Figura 3). Además, en la Figura 4 se observa que el efecto inhibidor de dicho péptido de la invención (SEQ ID NO: 2) se impide en presencia de un agente reductor (que rompe los puentes disulfuro), lo que pone de manifiesto la probable implicación de un puente disulfuro en el mecanismo de inhibición de la MAPK p38 por el péptido de la invención.

En consecuencia, el péptido de la invención puede ser utilizado en el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38.

Proteína de fusión de la invención

El péptido de la invención puede estar fusionado a otro péptido constituyendo de este modo una proteína de fusión. Puesto que la interacción entre el péptido de la invención y la MAPK p38 debe suceder en el interior de la célula, el péptido al que se fusiona el péptido de la invención es, ventajosamente, un péptido capaz de facilitar la entrada del péptido de la invención al interior de la célula.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una proteína de fusión de la invención que comprende:

(i) un péptido de la invención, y

(ii) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula.

Las características del péptido de la invención ya han sido mencionadas previamente.

Un "péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula", en ocasiones identificado en esta descripción como "péptido transportador", es un péptido capaz de atravesar la membrana celular y penetrar en una célula desde el exterior, característica que puede ser conferida al péptido (e.g., péptido de la invención) al que está fusionado proporcionando de este modo una alternativa al transporte de péptidos de interés (e.g., péptido de la invención) al interior de las células diana. Este mecanismo de entrada de péptidos a la célula es conocido como "transducción (o transporte) de proteínas" ("protein transduction or delivery"). Se conocen diversos péptidos transportadores con capacidad para internalizar un péptido en una célula [Schwarze S.R. *et al*., Science, 1999 Sep 3; 285(5433): 1569-72; Niesner U. *et al*., Bioconjug. Chem. 2002 Jul-Aug; 13(4):729-36; Ford K.G. *et al*., Gene Therapy, 2001; 8:1-4; y Gusarova G.A. *et al*., J. Clin. Invest. 2007 Jan; 117(1):99-111].

Prácticamente cualquier péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención; no obstante, en una realización particular, dicho péptido transportador es un péptido que comprende un segmento "PTD" (del inglés "protein transduction domain"). Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de proteínas que comprenden dichos dominios de transducción de proteínas (PTD) incluyen el factor de transcripción homeótico Antennapedia (Antp) de *Drosophila melanogaster* y la proteína de unión al ADN VP22 de herpesvirus simples 1 (HSV-1), aunque también se ha sugerido que esta propiedad de internalizar péptidos en células la poseen otras proteínas tales como la hemaglutinina de virus influenza, la lactoferrina, el factor de crecimiento de fibroblastos 1, el factor de crecimiento de fibroblastos 2 y las proteínas Hoxa-5, Hoxb-4 y Hoxc-8 [Ford K.G. *et al*., Gene Therapy, 2001; 8:1-4], En una realización particular, dicho péptido transportador se deriva de la proteína TAT (del inglés "transacting translational protein") del virus de la inmunodeficiencia humana 1 (HIV-1), y comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 [GRKKRRQRRRPP].

El péptido de la invención puede estar unido a cualquiera de los extremos (amino o carboxilo) terminal del péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido de la invención en una célula. Por tanto, en una realización particular, el extremo carboxilo terminal del péptido de la invención está unido al extremo amino terminal de dicho péptido transportador, mientras que, en otra realización particular, el extremo amino terminal del péptido de la invención está unido al extremo carboxilo terminal de dicho péptido transportador.

El péptido de la invención puede estar unido directamente, o no, a dicho péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula. Por tanto, en una realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido directamente a dicho péptido transportador [péptido (ii)], mientras que, en otra realización particular, el péptido de la invención [péptido (i)] está unido a dicho péptido transportador [péptido (ii)] a través de un péptido espaciador ("linker" o "spacer") entre dichos péptidos (i) y (ii). En consecuencia, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede contener, además, un péptido espaciador situado entre dicho péptido de la invención [péptido (i)] y dicho péptido transportador [péptido (ii)]. Ventajosamente, dicho péptido espaciador es un péptido con flexibilidad estructural, tal como un péptido que da lugar a un dominio no estructurado. Prácticamente cualquier péptido con flexibilidad estructural puede ser utilizado como péptido espaciador; no obstante, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos péptidos espaciadores incluyen péptidos que contienen repeticiones de restos de aminoácidos, e.g., de Gly y/o Ser, o cualquier otra repetición adecuada de restos de aminoácidos.

Opcionalmente, si se desea, la proteína de fusión de la invención puede incluir una secuencia aminoacídica útil para el aislamiento o purificación de la proteína de fusión de la invención. Dicha secuencia estará situada en una región de la proteína de fusión de la invención que no afecte adversamente a la funcionalidad del péptido de la invención. Prácticamente cualquier secuencia de aminoácidos que pueda ser utilizada para aislar o purificar una proteína de fusión (denominadas genéricamente péptidos etiqueta o "tag") puede estar presente en dicha proteína de fusión de la invención. A modo ilustrativo, no limitativo, dicha secuencia aminoacídica útil para aislar o purificar una proteína de fusión puede ser, por ejemplo, una cola de argininas (Arg-tag), una cola de histidinas (His-tag), FLAG-tag, Strep-tag, un epítopo susceptible de ser reconocido por un anticuerpo, tal como c-myc-tag, SBP-tag, S-tag, péptido de unión a calmodulina, dominio de unión a celulosa, dominio de unión a quitina, glutatión S-transferasa-tag, proteína de unión a maltosa, NusA, TrxA, DsbA, Avi-tag, etc. [Terpe K., Appl. Microbiol. Biotechnol. (2003), 60:523-525], β-galactosidasa, VSV-glicoproteína, etc.

Aplicaciones del péptido y proteínas de fusión de la invención

El péptido de la invención es un potente inhibidor de la MAPK p38. Diversos ensayos realizados por los inventores han puesto de manifiesto que dicho péptido no sólo reduce la activación y actividad sobre sustratos de dicha MAPK p38 así como la secreción de citoquinas inflamatorias sino que, además, reduce la hiperalgesia en un modelo animal. En consecuencia, el péptido de la invención puede ser utilizado en el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, una enfermedad inflamatoria, incluyendo las enfermedades autoinmunes; una enfermedad cardiaca; cáncer; una enfermedad neurodegenerativa; una enfermedad metabólica, por ejemplo, diabetes; y una enfermedad que cursa con dolor [para una revisión reciente véase Coulthard LR, White DE, Jones DL, McDermott MF, Burchill SA. Trends Mol Med. 2009 Aug;15(8):369-79. p38(MAPK): stress responses from molecular mechanisms to therapeutics].

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "enfermedades inflamatorias" incluye cualquier enfermedad causada por una activación descontrolada y continuada de las respuestas inflamatorias que causan daño en los tejidos; dicha respuesta inflamatoria puede ser desencadenada por agentes infecciosos, agentes físicos, agentes químicos, tumores y muerte celular. Las enfermedades autoinmunes, en la medida en que también tienen una componente inflamatoria, caen dentro del término "enfermedades inflamatorias" tal como aquí se utiliza. En general, las enfermedades inflamatorias se clasifican según el tejido dañado, por ejemplo, (i) las enfermedades inflamatorias intestinales que comprenden un conjunto de enfermedades cuya característica principal es la presencia de una inflamación crónica, sostenida o recurrente en el intestino, tales como la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis microscópicas (que engloban a la colitis colágena y la colitis linfocítica), enterocolitis eosinofílica, enfermedad injerto versus huésped (GVH) y la colitis actínica entre otras; (ii) las enfermedades inflamatorias de las articulaciones, por ejemplo, artritis reumatoide, artritis gotosa, polimialgia reumática, tendinitis y bursitis, entre otras; (iii) otras enfermedades inflamatorias como la psoriasis y el asma; y (iv) enfermedades que cursan con un componente inflamatorio aunque su etiología no sea fundamentalmente inflamatoria.

Composición farmacéutica de la invención

Para su administración a un sujeto, el péptido de la invención así como la proteína de fusión de la invención, se formulará en una composición farmacéutica apropiada.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con una composición farmacéutica, en adelante "composición farmacéutica de la invención", que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención, o de una proteína de fusión de la invención, o de sus sales farmacéuticamente aceptables, junto con, al menos, un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicha composición farmacéutica es útil para su administración y/o aplicación a un sujeto.

El término "sujeto", tal como aquí se utiliza, se refiere a un miembro de una especie de un animal mamífero e incluye, pero no se limita a, animales domésticos, primates y humanos; preferiblemente dicho sujeto es un ser humano masculino o femenino de cualquier edad o raza.

En el contexto de la presente invención se entiende por "cantidad terapéuticamente eficaz" la cantidad de péptido de la invención o proteína de fusión de la invención necesaria para conseguir el efecto deseado que, en este caso concreto, es el tratamiento y/o prevención de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades autoinmunes; enfermedades cardíacas; cáncer; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades metabólicas incluyendo diabetes; y enfermedades que cursan con dolor. La cantidad de péptido de la invención, o proteína de fusión de la invención, o de sus sales farmacéuticamente aceptables que puede estar presente en la composición farmacéutica de la invención puede variar dentro de un amplio intervalo. En general, la cantidad terapéuticamente efectiva del péptido según la presente invención a administrar dependerá, entre otros factores, del sujeto que vaya a ser tratado, de su edad, de su estado, de la severidad de la enfermedad que padezca dicho sujeto, de la forma de administración elegida, de la vía y frecuencia de administración del péptido o proteína de fusión de la invención a administrar, etc. Por este motivo, las dosis que se administrarán serán ajustadas por un experto en la materia, según las circunstancias.

El término "vehículo farmacéuticamente aceptable", tal como aquí se utiliza, se refiere a un vehículo que debe estar aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o un gobierno estatal o enumerado en la Farmacopea Estadounidense o la Farmacopea Europea, u otra farmacopea reconocida generalmente para su uso en animales, y más concretamente en humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, coadyuvante, excipiente o portador con el que se deben administrar los péptidos de la invención o las proteínas de fusión de la invención; obviamente, dicho vehículo debe ser compatible con dichos péptidos y proteínas de fusión de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede contener combinaciones de dos o más péptidos de la invención o proteínas de fusión de la invención, así como combinaciones de péptidos de la invención y proteínas de fusión de la invención.

La composición farmacéutica de la invención puede contener un péptido de la invención junto con, opcionalmente, uno o más, compuestos anti-inflamatorios, analgésicos, etc., diferentes a dicho péptido de la invención. Prácticamente, cualquier compuesto anti-inflamatorio, analgésico, etc., distinto a dicho péptido de la invención, puede estar presente, si se desea, en la composición farmacéutica de la invención. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos compuestos anti-inflamatorios, distintos al péptido de la invención, que pueden emplearse junto con el péptido de la invención incluyen, aunque no se limitan a, anti-inflamatorios no esteroideos, por ejemplo, derivados de ácidos aminoarilcarboxílicos (e.g., ácido flufenámico, ácido niflúmico, etc.), derivados de ácido arilacético (e.g., diclofenac, indometacina, oxametacina, etc.), derivados de ácido arilbutírico (e.g., butibufeno, etc.), derivados de ácido arilcarboxílico (e.g., ketorolac, etc.), derivados de ácido arilpropiónico (e.g., ibuprofeno, ketoprofeno, etc.), pirazoles (e.g., difenamizol, etc.), pirazolonas (e.g., fenilbutazona, etc.), derivados de ácido acetilsalicílico (e.g., ácido acetilsalicílico, etc.), tiazincarboxamidas (e.g., isoxicam, piroxicam, etc.), otros (e.g., celecoxib, infliximab, rofecoxib, etc.); anti-inflamatorios esteroideos, por ejemplo, betametasona, cortisona, metilprednisolona, etc.); etc. Asimismo, ejemplos ilustrativos, no limitativos, de dichos compuestos analgésicos, distintos al péptido de la invención, que pueden emplearse junto con el péptido de la invención incluyen, aunque no se limitan a, ácido acetilsalicílico, acetilsalicilato cálcico, perisoxal, salicilato sódico, etc. Ejemplos ilustrativos adicionales de dichos compuestos anti-inflamatorios o analgésicos pueden encontrarse en The Merck Index, 13th Edition, en el apartado "Therapeutic Category and Biological Activity Index".

Para el tratamiento de las patologías para las que están indicados, el principio activo (péptido de la invención y/o proteína de fusión de la invención) contenido en la composición farmacéutica de la invención puede ser administrado por cualquier medio que produzca el contacto de dicho péptido de la invención o proteína de fusión de la invención con el sitio de acción del mismo en el cuerpo humano o animal.

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden presentarse en cualquier forma de administración, por ejemplo, sólida, líquida, etc., y pueden administrarse por cualquier vía de administración apropiada, por ejemplo, por vía oral, parenteral (e.g., subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, intravenosa, etc.), rectal, tópica, etc., para lo cual incluirán los vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para la formulación de la forma de administración deseada. Ejemplos ilustrativos, no limitativos, de formas farmacéuticas de administración por vía oral incluyen comprimidos, cápsulas, granulados, soluciones, suspensiones, etc., las cuales pueden contener los vehículos apropiados convencionales, tales como aglutinantes, diluyentes, desintegrantes, lubrificantes, humectantes, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Las composiciones farmacéuticas de la invención también pueden ser adaptadas para su administración parenteral, en forma de, por ejemplo, soluciones, suspensiones o productos liofilizados, estériles, en la forma de dosificación apropiada; en este caso, dichas composiciones farmacéuticas de la invención incluirán los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, tales como tampones, tensioactivos, etc., y pueden ser preparadas por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia. Otras formas de administración de la composición farmacéutica de la invención incluyen aerosoles, colirios, pomadas, etc., para lo cual se utilizarán los vehículos farmacéuticamente aceptables apropiados. En cualquier caso, los vehículos farmacéuticamente aceptables se elegirán en función de la forma farmacéutica de administración seleccionada. Una revisión de las distintas formas farmacéuticas de administración de fármacos y de los vehículos farmacéuticamente aceptables necesarios para su obtención así como de sus métodos de producción puede encontrarse, por ejemplo, en el "Tratado de Farmacia Galénica", C. Faulí i Trillo, 1993, Luzán 5, S.A. Ediciones, Madrid; y en Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20ª edición, Williams & Wilkins PA, USA (2000).

Usos terapéuticos del péptido de la invención y de la proteína de fusión de la invención

El péptido de la invención o de la proteína de fusión de la invención, así como sus sales farmacéuticamente aceptables, pueden ser utilizados en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38.

En el contexto de la presente invención la expresión "enfermedad mediada por la MAPK p38" o "enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de la MAPK p38" incluye todo tipo de enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor, por ejemplo, enfermedades inflamatorias, incluyendo las enfermedades autoinmunes; enfermedades cardíacas; cáncer; enfermedades neurodegenerativas; enfermedades metabólicas incluyendo diabetes; y enfermedades que cursan con dolor.

El término "dolor", según se utiliza en la presente invención se refiere a una experiencia sensorial (objetiva) y emocional (subjetiva), generalmente desagradable, que pueden experimentar todos aquellos seres que disponen de un

sistema nervioso. Es una experiencia asociada a una lesión tisular y se puede referir bien a dolor agudo o crónico. El dolor agudo está causado por daño tisular inmediato (por ejemplo, una quemadura o un corte). Se trata de un mecanismo natural de defensa en respuesta al daño tisular, previniendo el uso de la parte del cuerpo dañada y la retirada del estímulo doloroso. En contraste, el dolor crónico persiste por tres o más meses, e incluso después de que el daño se haya curado, y puede llevar a cambios significativos en la calidad de vida de un paciente [Foley, Pain, Cecil Textbook of Medicine 100-107, JC Bennett and F. Plum eds., 20th ed., Goldman Bennet 1996], Los péptidos y proteínas de fusión de la invención también pueden utilizarse para el tratamiento y/o prevención de dolor inflamatorio, que generalmente es resultado de una respuesta inflamatoria a daño tisular, como pinzamiento de nervios, métodos quirúrgicos, cáncer o artritis [Brower, Nature Biotechnology 2000; 18: 387-391], La mayoría de los pacientes con dolor inflamatorio no experimentan dolor de manera continua, sino que experimentan más dolor cuando mueven el sitio inflamado. En una realización particular, los péptidos y proteínas de fusión de la invención se utilizan para el tratamiento y/o prevención de uno de los siguientes desórdenes relacionados con dolor: dolor crónico, dolor neuropático, dolor dental, dolor post-operativo, dolor reumatoide, dolor osteoartítico, dolor de espalda, dolor visceral, dolor por cáncer, neuralgia, migraña, neuropatías, dolor relacionado con neuropatía diabética, ciática, neuropatía relacionada con VIH, neuralgia post-herpética, fibromialgia, dolor asociado con daño en las fibras nerviosas, dolor asociado con isquemia, dolor asociado con neurodegeneración, dolor asociado con infarto, dolor post-infarto, dolor asociado con esclerosis múltiple, dolor secundario a desórdenes inflamatorios, dolor asociado con enfermedad inflamatoria intestinal, dolor asociado con cistitis, dolor asociado a quemaduras, dolor asociado a psoriasis.

El término “tratamiento”, según se usa en el contexto de esta memoria significa administración de un péptido de la invención o proteína de fusión de la invención para aliviar o eliminar una de las enfermedades mencionadas anteriormente o reducir o eliminar uno o más síntomas asociados a dicha enfermedad. El término “tratamiento” también abarca aliviar o eliminar las secuelas fisiológicas de la enfermedad. El término “prevención”, tal como se usa en la presente invención, se refiere a la capacidad de un péptido de la invención o de una proteína de fusión de la invención de prevenir, minimizar o dificultar la aparición o el desarrollo de una enfermedad o estado antes de su aparición. En este caso, las enfermedades que se previenen y/o se tratan, sin limitarse a éstas, incluyen las enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de un péptido de la invención o de una proteína de fusión de la invención en la elaboración de una composición farmacéutica (o medicamento) para la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor; o, alternativamente, expresado en otros términos, en otro aspecto, la invención se relaciona con un péptido de la invención o con una proteína de fusión de la invención para su empleo en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, una enfermedad que cursa con inflamación y/o dolor, que comprende administrar a un sujeto en necesidad de tratamiento una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido de la invención o de una proteína de fusión de la invención.

Obtención del péptido y proteína de fusión de la invención

El péptido de la invención se puede obtener por métodos sintéticos convencionales, por ejemplo, mediante técnicas de síntesis química sobre fase sólida, y purificar mediante métodos convencionales, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Adicionalmente, si se desea, se puede analizar mediante técnicas convencionales, por ejemplo, mediante secuenciación y espectrometría de masas, análisis de aminoácidos, resonancia magnética nuclear, etc. A modo ilustrativo, no limitativo, el péptido de la invención puede obtenerse mediante síntesis peptídica siguiendo procedimientos convencionales [Merrifield RB. J Am Chem Soc 1963; 85:2149-2154] utilizando la variante Fmoc de Atherton [Atherton, E., *et al*. 1989. Peptide synthesis II. Procedures for solid phase synthesis using N-fluorenyl methoxycarbonyl aminoacids on polyamide supports. Synthesis of substance P and of acyl carrier protein 65-74 decapeptide. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1:538], La pureza del péptido obtenido puede determinarse mediante, por ejemplo, cromatografía HPLC de fase inversa y/o espectrometría de masas.

Alternativamente, el péptido de la invención así como la proteína de fusión de la invención pueden obtenerse mediante la tecnología del ADN recombinante. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona un ácido nucleico, en adelante “ácido nucleico de la invención”, que codifica el péptido de la invención o la proteína de fusión de la invención. La secuencia de nucleótidos de dicho ácido nucleico de la invención puede ser deducida fácilmente a partir de la secuencia de aminoácidos del péptido de la invención.

Dicho ácido nucleico de la invención puede estar contenido en una construcción génica. Por tanto, en otro aspecto, la invención proporciona una construcción génica que comprende dicho ácido nucleico de la invención. Dicha construcción génica puede incorporar, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión del ácido nucleico de la invención. Las secuencias de control son secuencias que controlan y regulan la transcripción y, en su caso, la traducción del péptido de la invención, o de la proteína de fusión de la invención, e incluyen secuencias promoto-

ras, terminadoras, etc., funcionales en células hospedadoras transformadas que comprenden dicho ácido nucleico de la invención o construcción génica proporcionada por esta invención. En una realización particular, dicha secuencia de control de expresión es funcional en bacterias. Ventajosamente, dicha construcción génica comprende, además, un marcador o gen que codifica un motivo o para un fenotipo que permita la selección de la célula hospedadora transformada con dicha construcción génica. La construcción génica proporcionada por esta invención puede obtenerse mediante el empleo de técnicas ampliamente conocidas en el estado de la técnica [Sambrook *et al*., "Molecular cloning, a Laboratory Manual", 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989 Vol 1-3].

El ácido nucleico o la construcción génica proporcionados por esta invención, pueden ser insertados en un vector apropiado. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un vector, tal como un vector de expresión, que comprende dicho ácido nucleico de la invención o dicha construcción génica proporcionada por esta invención. La elección del vector dependerá de la célula hospedadora en la que se va a introducir posteriormente. A modo de ejemplo, el vector donde se introduce dicho ácido nucleico de la invención puede ser un plásmido o un vector que, cuando se introduce en una célula hospedadora, se integra o no en el genoma de dicha célula. La obtención de dicho vector puede realizarse por métodos convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrok *et al*., 1989, citado *supra*].

En otro aspecto, la invención se relaciona con una célula hospedadora, tal como una célula hospedadora transformada, que comprende dicho ácido nucleico o dicha construcción génica proporcionados por esta invención o un vector según se ha mencionado anteriormente. Dicha célula puede ser una célula procariota o eucariota.

Asimismo, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para producir un péptido de la invención o una proteína de fusión de la invención que comprende crecer una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la invención, o una construcción génica o vector proporcionados por esta invención, bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido de la invención y, si se desea, recuperar dicho péptido de la invención o dicha proteína de fusión de la invención. Las condiciones para optimizar el cultivo de dicha célula hospedadora dependerán de la célula hospedadora utilizada. Si se desea, el procedimiento para producir el péptido de la invención o la proteína de fusión de la invención incluye, además, el aislamiento y purificación de dicho péptido de la invención o de dicha proteína de fusión de la invención.

Por otra parte, dicho ácido nucleico de la invención así como las construcciones génicas proporcionadas por esta invención pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores y células para tratar una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor. Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de dicho ácido nucleico de la invención o de dichas construcciones génicas proporcionadas por esta invención en la elaboración de vectores y células para el tratamiento de una enfermedad mediada por la MAPK p38, tal como una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38, por ejemplo, enfermedades que cursan con inflamación y/o dolor. De acuerdo con este aspecto de la invención, dicho ácido nucleico de la invención o dicha construcción génica proporcionada por esta invención se pone en contacto con un vector de transferencia génica, tal como un vector viral o no viral. Vectores virales apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no están limitados a, vectores adenovirales, vectores adenoasociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, vectores alfavirales, vectores herpesvirales, vectores derivados de coronavirus, etc. Vectores de tipo no viral apropiados para poner en práctica esta realización de la invención incluyen, pero no se limitan a ADN desnudo, liposomas, poliaminas, dendrímeros, glicopolímeros catiónicos, complejos liposoma-policatión, proteínas, sistemas de transferencia génica mediados por receptor, etc.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma.

Ejemplo 1

Inhibición de la fosforilación de la MAPK p38

Se realizó este ensayo para cuantificar el efecto de unos péptidos derivados de MEF2A (Chang *et al*, 2002. Mol Cell. Vol 9, 1241-49) sobre la fosforilación de la MAPK p38 por MKK6 *in vitro.*

Para ello, brevemente, se analizó la fosforilación *in vitro* de una MAPK p38 recombinante (Invitrogen, Ref.#PV3305) por MKK6 (Millipore-Upstate, Ref.#14-303) purificada en presencia de un péptido de la invención [MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2)] sintetizado por la compañía JPT Peptides Technologies (http://www.jpt.com) o de los péptidos derivados de la secuencia cristalizada de la proteína MEF2A identificados como MEF2A long [RKPDLRVVIPPS] (SEQ ID NO: 3), MEF2A short [KPDLRVVIPP] (SEQ ID NO: 4) y MEF2AxArg [KPDLRVRIPP] (SEQ ID NO: 5) sintetizados igualmente por la compañía JPT Peptides Technologies a diversas concentraciones (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100, 500 y 1.000 micromolar (μM). Todos los aminoácidos presentes en los péptidos utilizados en este ensayo tenían la configuración L.

Tras la reacción de fosforilación *in vitro* en un tampón de reacción Tris/HCl 100 mM, pH 7,5, EGTA (ácido etilenglicol tetraacético) 0,2 mM, ortovanadato sódico 0,2 mM, acetato de magnesio 10 mM, DMSO 2%, ditiotreitol

(DTT) 1 mM y ATP 0,1 mM, durante 15 min a 30ºC con agitación, se cuantificó la cantidad de MAPK p38 fosforilada en el bucle de activación (secuencia TGY) mediante Western Blot con el anticuerpo anti-fosfo-T180-Y182-p38 de la compañía Cell Signaling (http://www.cellsignal.com/ Ref#9211). Los resultados del Western Blot se muestran en la Figura 3 A. El control de la reacción [“vehículo” (Veh)] se realizó en ausencia de péptido pero incluyendo el disolvente del péptido (con un 2% DMSO).

Los resultados obtenidos en el Western Blot se relativizaron (normalizaron) a los obtenidos con un péptido control identificado como L-MEF2A scrambled (“scrmbld”) [corresponde al péptido MEF2A scrambled, cuya secuencia de aminoácidos es PDIKLPVRPSRV (SEQ ID NO: 6), en el que los aminoácidos tienen la configuración L] sintetizado por JPT Peptides Technologies y se recogen en la Figura 3B, en donde se muestra la reducción de la activación de la MAPK p38 por MKK6 en presencia de los péptidos ensayados.

Finalmente se determinó la concentración inhibitoria media (IC_{50}) *in vitro* de esta reacción para cada péptido ensayado como medida de la efectividad de un compuesto para inhibir esta función bioquímica. Los resultados de la IC_{50} obtenida en cada caso se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 3C.

TABLA 1

IC_{50} de los péptidos ensayados

Péptido	**Secuencia**	**SEQ ID NO:**	**IC_{50} (µM)**
MEF2A long	RKPDLRVVIPPS	3	700
MEF2A short	KPDLRVVIPP	4	> 1.000
MEF2AxArg	KPDLRVRIPP	5	500
MEF2AxCys	KPDLRVVICP	2	5

Como puede apreciarse, se observa un potente efecto inhibidor del péptido proporcionado por esta invención [MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2)] sobre la fosforilación *in vitro* de MAPK p38 recombinante por MKK6, efecto que no se observa en otros péptidos con secuencias aminoacídicas similares pero que carecen de una cisteína en la penúltima posición. Al comparar los resultados obtenidos con los péptidos MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) (invención) y MEF2A short (SEQ ID NO: 4) cuya única diferencia radica en la presencia de una cisteína [MEF2AxCys (invención)] en lugar de una prolina [MEF2A short], se observa que la capacidad del péptido MEF2A short de inhibir la activación de la MAPK p38 es muy baja, más de 200 veces menor, que la del péptido MEF2AxCys (invención). Otras mutaciones de un solo amino ácido en la secuencia original, por ejemplo el cambio de una valina por una arginina en el péptido MEF2AxArg (SEQ ID NO: 5), consiguieron incrementar el efecto inhibidor del péptido MEF2A short únicamente en un factor de 2 veces.

Posteriormente se analizó la inhibición de la fosforilación *in vitro* de la MAPK p38 recombinante por MKK6 purificada por un péptido proporcionado por esta invención [MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2)] en un tampón que contenía (o no) un agente reductor [ditiotreitol (DTT)], en distintas concentraciones (1 y 10 mM), con el fin de determinar la implicación de un posible puente disulfuro en el efecto inhibidor de la fosforilación de la MAPK p38 por dicho péptido. Siguiendo el protocolo previamente mencionado, con la salvedad de que en algunas ocasiones el tampón de reacción contenía DTT y en otras no, tras la reacción de fosforilación *in vitro* se cuantificó la cantidad de MAPK p38 fosforilada mediante Western Blot con anticuerpos anti-fosfo-T180-Y182-p38. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4, en donde puede apreciarse que la presencia de DTT a una concentración de 10 mM en el ensayo debilita el efecto inhibidor del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2), lo que parece sugerir que la presencia de un puente disulfuro puede ser la base molecular de la actividad inhibitoria de dicho péptido.

A la vista de los resultados mostrados en las Figuras 3 y 4, se puede concluir que el efecto inhibidor del péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2), proporcionado por esta invención, parece ser debido, entre otros factores, a la presencia de una cisteína en dicho péptido ya que otros péptidos con secuencias aminoacídicas muy similares pero que carecen de cisteína no muestran ese efecto inhibidor *in vitro* de la MAPK p38, y, además, que este efecto parece estar basado en la formación de un puente disulfuro ya que el efecto inhibidor de dicho péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) se ve afectado adversamente por una alta concentración de un agente reductor (tal como DTT a 10 mM, que reduce y rompe los puentes disulfuro).

Ejemplo 2

Inhibición de la activación de MAPK p38 en respuesta a LPS y de su actividad en monocitos humanos en presencia de péptidos inhibidores de MAPK p38

Se realizó este ensayo para analizar el efecto del péptido L-MEF2AxCys [corresponde al péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] sobre la activación de la MAPK p38 y sobre su actividad en una línea celular de monocitos humanos (THP-1) (American Type Culture Collection: http://www.atcc.org/) tratados con diferentes concentraciones de dicho péptido. Brevemente, células monocíticas humanas de dicha línea celular de monocitos humanos THP1, a una densidad de unas 10^6 células/ml, fueron estimuladas con LPS bacteriano (Sigma #L2654) a una concentración de entre 1 y 10 mg/ml (que puede variar dependiendo del lote) durante 1 hora en ausencia o presencia del péptido L-MEF2AxCys cuyo extremo amino estaba fusionado a la secuencia TAT [GRKKRRQRRRPP (SEQ ID NO: 7)], sintetizado por el Servicio de Proteómica del Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), a distintas concentraciones (1 μM, 5 μM y 10 μM) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final del 0,1%. Como control se utilizó el péptido MEF2AxCys scrambled ("scrmbγ") [corresponde a un péptido con los mismos aminoácidos que el péptido MEF2AxCys pero en una secuencia desordenada (SEQ ID NO: 8)] fusionado en su extremo amino a dicha secuencia TAT (SEQ ID NO: 7), también sintetizado por el Servicio de Proteómica del CBMSO. Las células se Usaron en un tampón Tris/HCl 100 mM pH 7,5, EDTA 200 mM, benzamidina 1 μM, STI (del inglés "soybean trypsin inhibitor" - inhibidor de tripsina de soja) 10 mg/ml, bacitracina 10 mg/ml, aprotinina 80 mU/ml, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 μM y phosSTOP (Roche, Ref.#04906845001). Posteriormente se analizaron las muestras por Western Blot con anticuerpos específicos. Brevemente, la activación de la MAPK p38 se analizó cuantificando por densitometría la cantidad de MAPK p38 fosforilada en el bucle de activación (TGY) mediante Western Blot con anticuerpos anti-fosfo-T180-Y182-p38 (Cell Signaling, Ref.#9211) y normalizando los valores con los obtenidos para los niveles de MAPK p38 total en cada lisado. Asimismo, la actividad de la MAPK p38 se cuantificó por densitometría de la fosforilación de sus sustratos MK2 y Hsp27 analizada mediante Western Blot con anticuerpos específicos frente a dichas proteínas fosforiladas: anti-fosfo-T334-MK2 (Cell Signaling, Ref.#3041) y anti-fosfo-S78-HSP27 (Cell Signaling, Ref#2405) y normalizando los valores con los obtenidos para los niveles de p38 MAPK totales en cada lisado.

Los controles positivo (C+) y negativo (C-) contenían la misma cantidad de DMSO que los puntos con péptido, sin LPS en el caso de los controles negativos (C-). Se realizó un control adicional con el péptido L-MEF2AxCys scrambled ("scrbl") [correspondiente al péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] unido en su extremo amino a la secuencia TAT (SEQ ID NO: 7), también disuelto en DMSO a una concentración de 10 μM.

Los resultados del Western Blot se muestran en la Figura 5A, en donde "scrbl" se refiere al péptido L-MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) fusionado en su extremo amino a la secuencia TAT (SEQ ID NO: 7), "pp38" es MAPK p38 fosforilada en el bucle de activación (TGY), "p38 total" es MAPK p38 total, "pMK2" es MK2 fosforilada, y "pHsp27" es Hsp27 fosforilada.

Los resultados obtenidos en el Western Blot se normalizaron con los valores obtenidos para los niveles de p38 MAPK total en cada lisado y se recogen en la Figura 5B, en donde se muestra una reducción de la activación de la p38 MAPK en presencia del péptido L-MEF2AxCys, dependiente de la concentración del péptido, llegando a ser prácticamente nula a una concentración de 10 μM, y, consecuentemente, una disminución del mismo orden de la fosforilación de los sustratos MK2 y Hsp27. Los resultados obtenidos demuestran que la presencia del péptido de la invención (MEF2AxCys) es capaz de impedir tanto la activación de p38 como la transmisión de su señales a sus sustratos en células monocíticas humanas, con un efecto que llega a ser del 100% de inhibición a concentraciones de un orden de micromolar del péptido, lo cual indica que dicho péptido proporcionado por esta invención (MEF2AxCys) constituye un inhibidor eficaz de la ruta de la MAPK p38.

Ejemplo 3

Secreción de TNF-α en respuesta a LPS y supervivencia de monocitos en presencia de péptidos inhibidores de MAPK p38

Se realizó este ensayo para analizar el efecto del péptido L-MEF2AxCys [corresponde al péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en el que los aminoácidos tienen la configuración L] y del péptido D-MEF2AxCys [corresponde al péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) en el que los aminoácidos tienen la configuración D] sobre la secreción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en respuesta a lipopolisacárido (LPS) bacteriano en monocitos humanos (THP-1) y sobre la supervivencia de dichos monocitos THP-1 en presencia de dichos péptidos. Brevemente, células de la línea de monocitos humanos THP1 (ATCC), a una densidad de unas 10^6 células/ml, fueron estimuladas con LPS bacteriano (Sigma, Ref.#L2654) a una concentración de 1 mg/ml durante 4 horas en presencia del péptido D-MEF2AxCys, sintetizado por el servicio EvoQuest™ de la compañía Invitrogen, o del péptido L-MEF2AxCys, sintetizado por el Servicio de Proteómica del CBMSO [cada uno de ellos, independientemente, estaba fusionado, en su extremo amino, a la secuencia TAT (SEQ ID NO: 7)], disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) o las cantidades equivalentes de los péptidos control con secuencias que contenían los mismos aminoácidos pero en secuencia desordenada ("scrambled" = scrbld), concretamente los péptidos L-MEF2AxCys scrambled [corresponde al péptido MEF2A scrambled (SEQ ID NO: 8)

en el que los aminoácidos tienen la configuración L], sintetizado por el Servicio de Proteómica del CBMSO, y D-MEF2AxCys scrambled [corresponde al péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración D] sintetizado por el servicio EvoQuest™ de Invitrogen [cada uno de ellos, independientemente, estaba fusionado, en su extremo amino, a la secuencia TAT (SEQ ID NO: 7)], también disueltos en DMSO, a distintas concentraciones (0,001, 0,01, 0,1, 1, 10, 100 y 1.000 μM). La cantidad de TNF-α secretado al medio en respuesta a LPS se cuantificó mediante un ensayo de ELISA (BioTrak, Ref.#RPN2758, GE-Amersham) siguiendo las instrucciones del fabricante. La viabilidad celular se cuantificó mediante citometría de flujo FACS (FACScalibur, Becton Dickinson) tras tinción de las células tratadas con ioduro de propidio (1 mg/1) y cuantificación de la cantidad de células positivas para esta tinción (Software Cell Quest Pro). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 2 y en la Figura 6.

TABLA 2

IC_{50} de los péptidos ensayados

Péptido	**IC_{50} (µM)**
L-MEF2AxCys	3
D-MEF2AxCys	3

IC_{50}: Concentración inhibitoria media [concentración de compuesto que produce una inhibición del 50% de una función biológica o bioquímica].

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que tanto el péptido L-MEF2AxCys como su estereoisómero artificial resistente a proteasas, el péptido D-MEF2AxCys, son potencialmente útiles como agentes anti-inflamatorios ya que son capaces de reducir la secreción de TNF-α en monocitos humanos THP-1 estimulados por LPS bacteriano. Sin embargo, ese efecto no se observa con los péptidos L-MEF2AxCys scrambled ni D-MEF2AxCys scrambled en las concentraciones ensayadas (0,001, 0,01, 0,1, 1y 10 μM), lo que demuestra que el efecto se debe exclusivamente a la secuencia concreta de los péptidos y no a la mera presencia de péptidos con esos mismos aminoácidos dentro de la célula. Asimismo, dichos resultados muestran que la toxicidad del péptido L-MEF2AxCys es ligeramente menor que la del péptido D-MEF2AxCys.

Ejemplo 4

Efecto de péptidos inhibidores de MAPK p38 sobre hiperalgesia inducida en ratones

Se realizó este ensayo para analizar el efecto del péptido L-MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) sobre la hiperalgesia inducida en ratones. Para la realización de este ensayo se siguió un protocolo descrito previamente [Willemen HL, *et al*., Microglial/macrophage GRK2 determines duration of peripheral IL-1beta-induced hyperalgesia: contribution of spinal cord CX3CR1, p38 and IL-1 signaling. Pain. 2010 Sep;150(3):550-60; y Eijkelkamp N, *et al*., GRK2: a novel cell-specific regulator of severity and duration of inflammatory pain. J Neurosci. 2010 Feb 10;30(6):2138-49], Brevemente, ratones hembra BL6-GRK2+/- (C57BL/6 hemicigotos para GRK2 dado que los homocigotos GRK2-/- son letales, obtenidos del laboratorio del Dr. Marc Carón de la Universidad de Duke, EEUU; y descritos en Jaber M *et al*. (1996) Essential role of betaadrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. Proc Natl Acad Sci USA 93:12974 - 12979) (2 ratones por grupo, 4 patas por cada condición) se sometieron a una inyección intraplantar de carragenano (Sigma-Aldrich, 5 μL de una disolución al 1% en suero salino) para inducirles hiperalgesia de tipo inflamatorio en las extremidades. A los 7 días post-inyección del carragenano, se determinó el tiempo de latencia de la retirada de la pata en contacto con el calor como indicativo del dolor de tipo inflamatorio a tiempo 0 (T=0). Posteriormente, se les inyectó por vía intratecal bien el inhibidor establecido de MAPK p3 8 SB239063 [*trans*-4-[4-(4-fluorofenil)-5-(2-metoxi-4-pirimidinil)-1*H*-imidazol-1-il]ciclohexanol] (5 μg en 5 μL de DMSO al 20%), o bien los péptidos:

- L-MEF2AxCys, 2 μg en 5 μL de DMSO al 20%;
- L-MEF2AxCys, 10 μg en 5 μL de DMSO al 20%; o
- L-MEF2AxCys scrambled [corresponde al péptido MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) en el que los aminoácidos tienen la configuración L], 10 μg en 5 μL de DMSO al 20%.

[Cada uno de los péptidos utilizados en este ensayo, independientemente, estaba fusionado, en su extremo amino, a la secuencia TAT (SEQ ID NO: 7)].

Se midió entonces, a diferentes tiempos (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 1 día, 2 días, 3 días, 4 días y 8 días post-inyección de los compuestos a ensayar) los períodos de latencia de la retirada de la pata. Los resultados obtenidos se muestran en las Figuras 7 y 8. Como puede apreciarse:

- el compuesto SB239063 redujo la hiperalgesia inducida a ratones a los tiempos de 1, 2 y 4 horas tras su inyección; sin embargo, a las 6 horas post-inyección, la reducción de la hiperalgesia era menos pronunciada y a las 24 tras su administración la hiperalgesia había regresado a los niveles previos a los de la administración del compuesto SB239063;

- el efecto de la administración del péptido L-MEF2AxCys a la dosis de 2 μg (Figura 7), mostró dos fases; inicialmente, hubo una reducción de la hiperalgesia inducida en los ratones que desapareció hacia las 6 horas post-administración del péptido, volviéndose a los niveles anteriores a los de la inyección del péptido; sin embargo, a las 24 horas, se produjo de nuevo una reducción de la hiperalgesia inducida en los ratones que se mantuvo durante al menos 72 horas (lo que constituye una mejora sobre el efecto producido por SB239063);

- el efecto de la administración del péptido L-MEF2AxCys a la dosis de 10 μg (Figura 8), mostró dos fases; inicialmente, hubo una reducción de la hiperalgesia inducida en los ratones y, aunque a las 6 h disminuyó la reducción de la hiperalgesia, se mantuvo el efecto analgésico por inflamación sin alcanzar niveles de hiperalgesia similares a los niveles previos a la inyección del péptido; a las 24 horas, se produjo de nuevo una reducción de la hiperalgesia inducida en los ratones que se mantuvo durante más tiempo [detectable a los 8 días post-inyección del péptido en la dosis indicada (10 μg)], lo que constituye una mejora sobre el efecto producido por SB239063; y

- la administración del péptido L-MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) no tuvo un efecto sobre la hiperalgesia inducida en los ratones, lo cual indica que es la presencia del péptido en la secuencia adecuada y no de un péptido de la misma composición aminoacídica la responsable del efecto observado.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1:

Xaa1-Pro-Xaa2-Xaa3-Xaa4-Xaa5-Xaa6-Xaa7-Cys-Pro

en donde

Xaa1 es Arg o Lys;

Xaa2 es Asp o Glu;

Xaa3 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa4 es Arg o Lys;

Xaa5 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa6 es Ile, Leu, Met o Val;

Xaa7 es Ile, Leu, Met o Val;

Cys es cisteína; y

Pro es prolina; o

una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. Péptido según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos mostrada en dicha SEQ ID NO: 1.

3. Péptido según la reivindicación 1 ó 2, en el que

Xaa1 es Lys; o

Xaa2 es Asp; o

Xaa3 es Leu; o

Xaa4 es Arg; o

Xaa5 es Val; o

Xaa6 es Val; o

Xaa7 es Ile.

4. Péptido según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [KPDLRVVICP].

5. Péptido según la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos está constituida por la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 [KPDLRVVICP] o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

6. Una proteína de fúsión que comprende:

(i) un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; y

(ii) un péptido transportador con capacidad para internalizar un péptido en una célula.

7. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una proteína de fusión según la reivindicación 6, junto con, al menos, un excipiente farmacéuticamente aceptable.

8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, que comprende, además de, al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una proteína de fusión según la reivindicación 6, uno o más, compuestos anti-inflamatorios y/o analgésicos.

9. Empleo de un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una proteína de fusión según la reivindicación 6, en la elaboración de una composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiaca, cáncer, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad metabólica y/o del dolor.

10. Empleo según la reivindicación 9, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmune, y dicha enfermedad metabólica es diabetes.

11. Un ácido nucleico que codifica un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o una proteína de fusión según la reivindicación 6.

12. Una construcción génica que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11.

13. Construcción génica según la reivindicación 12, que comprende, además, operativamente unida, una secuencia reguladora de la expresión de dicho ácido nucleico.

14. Un vector que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11, o una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13.

15. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico según la reivindicación 11, o una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, o un vector según la reivindicación 14.

16. Un procedimiento para producir un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, o una proteína de fusión según la reivindicación 6, que comprende crecer una célula hospedadora según la reivindicación 15 bajo condiciones que permiten la producción de dicho péptido, o dicha proteína de fusión, y, si se desea, recuperar dicho péptido o proteína de fusión.

17. Empleo de un ácido nucleico según la reivindicación 11, o de una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 12 ó 13, en la elaboración de vectores y células para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad inflamatoria, una enfermedad cardiaca, cáncer, una enfermedad neurodegenerativa, una enfermedad metabólica y/o del dolor.

18. Empleo según la reivindicación 17, en el que dicha enfermedad inflamatoria es una enfermedad autoinmune, y dicha enfermedad metabólica es diabetes.

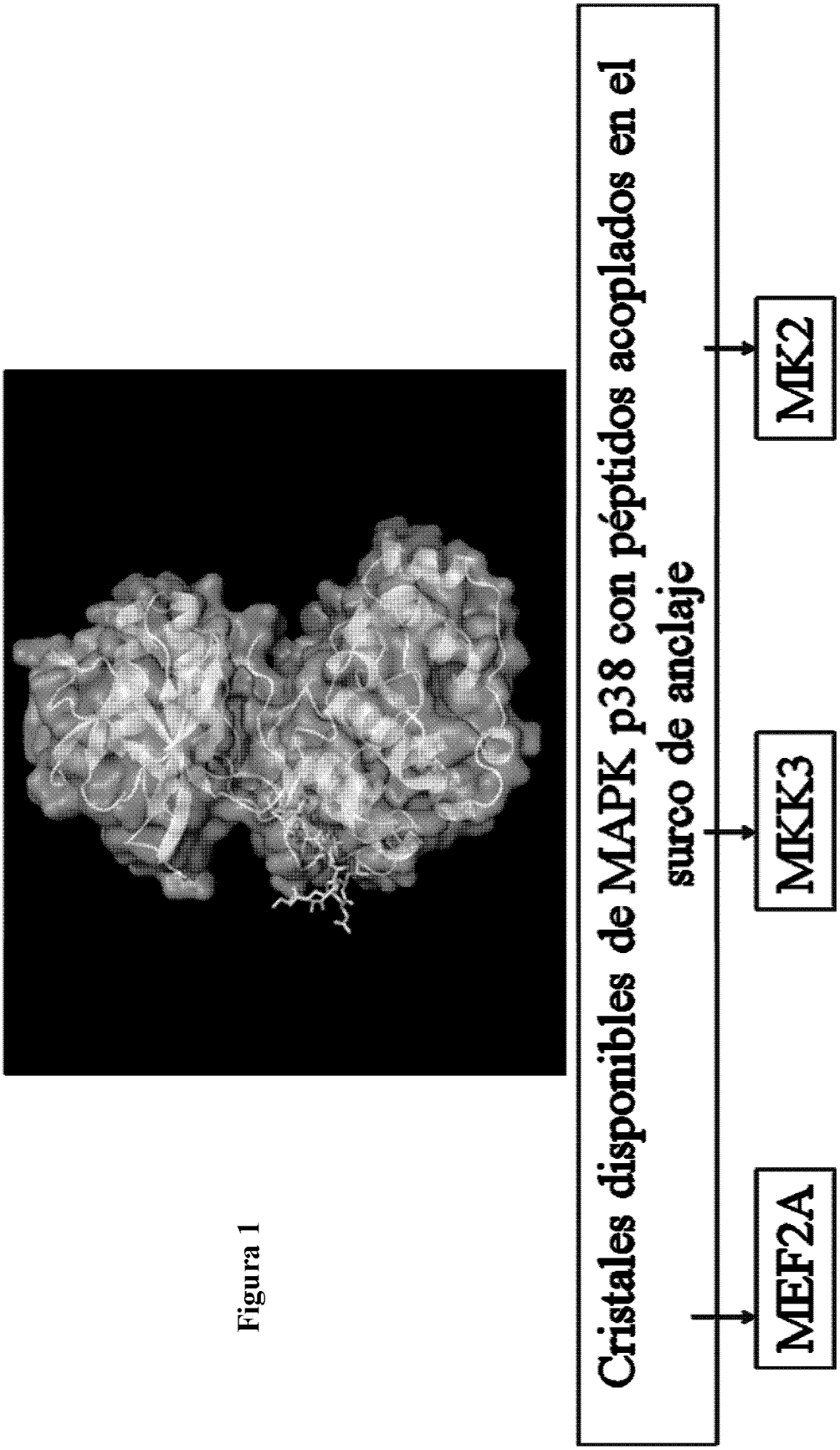
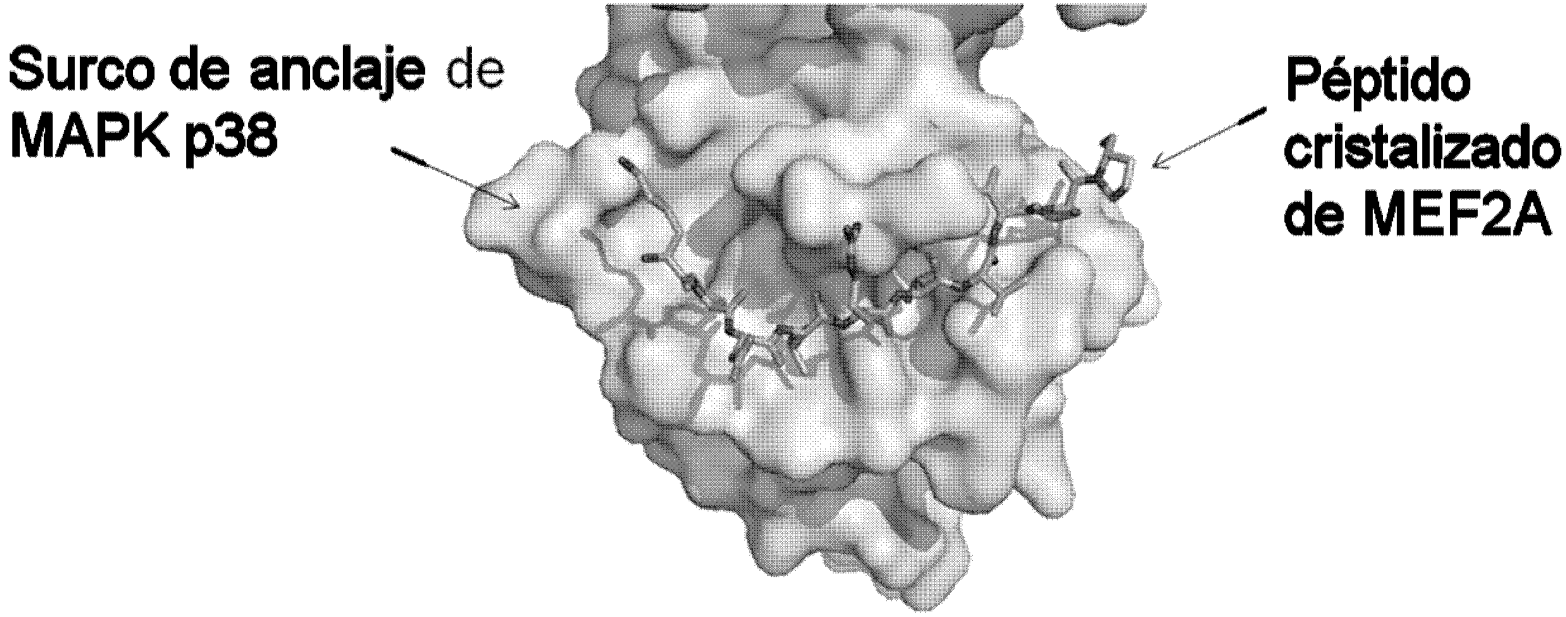

Cristales disponibles de MAPK p38 con péptidos acoplados en el surco de anclaje
MEF2A
MKK3
MK2

Figura 1



Péptidos diseñados a partir de MEF2A:

MEF2A long (SEQ ID NO: 3) RKPDLRVVIPPS
MEF2A short (SEQ ID NO: 4) KPDLRVVIPP
MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2) KPDLRVVICP

MEF2A scrambled (SEQ ID NO: 6) PDIKLPVRPSRV
MEF2AxCys scrambled (SEQ ID NO: 8) VIPKRPVCLD

Figura 2

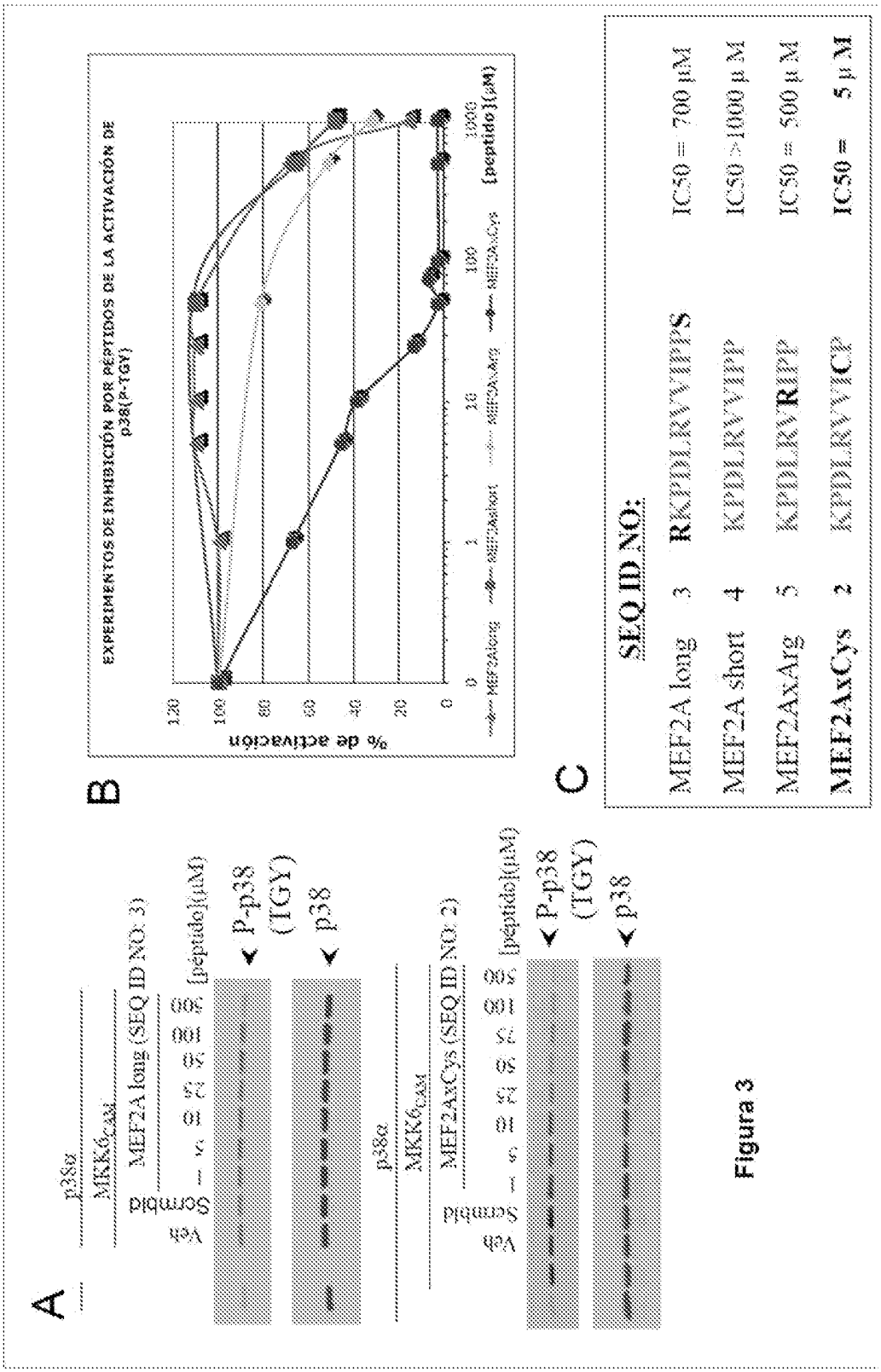

A
p38α
MKK6CAM
MEF2A long (SEQ ID NO: 3)
Veh
Scrambl
[péptido](μM)
P-p38 (TGY)
p38
p38α
MKK6CAM
MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2)
Veh
Scrambl
[péptido](μM)
P-p38 (TGY)
p38
B
EXPERIMENTOS DE INHIBICIÓN POR PÉPTIDOS DE LA ACTIVACIÓN DE p38(P-TGY)
% de activación
120
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
1000
[peptido](μM)
MEF2Along
MEF2Ashort
MEF2AxArg
MEF2AxCys
C
SEQ ID NO:
MEF2A long 3 RKPDLRVYIPPS IC50 = 700 μM
MEF2A short 4 KPDLRVYIPP IC50 >1000 μ M
MEF2AxArg 5 KPDLRVRIPP IC50 = 500 μ M
MEF2AxCys 2 KPDLRVYICP IC50 = 5 μ M

Figura 3

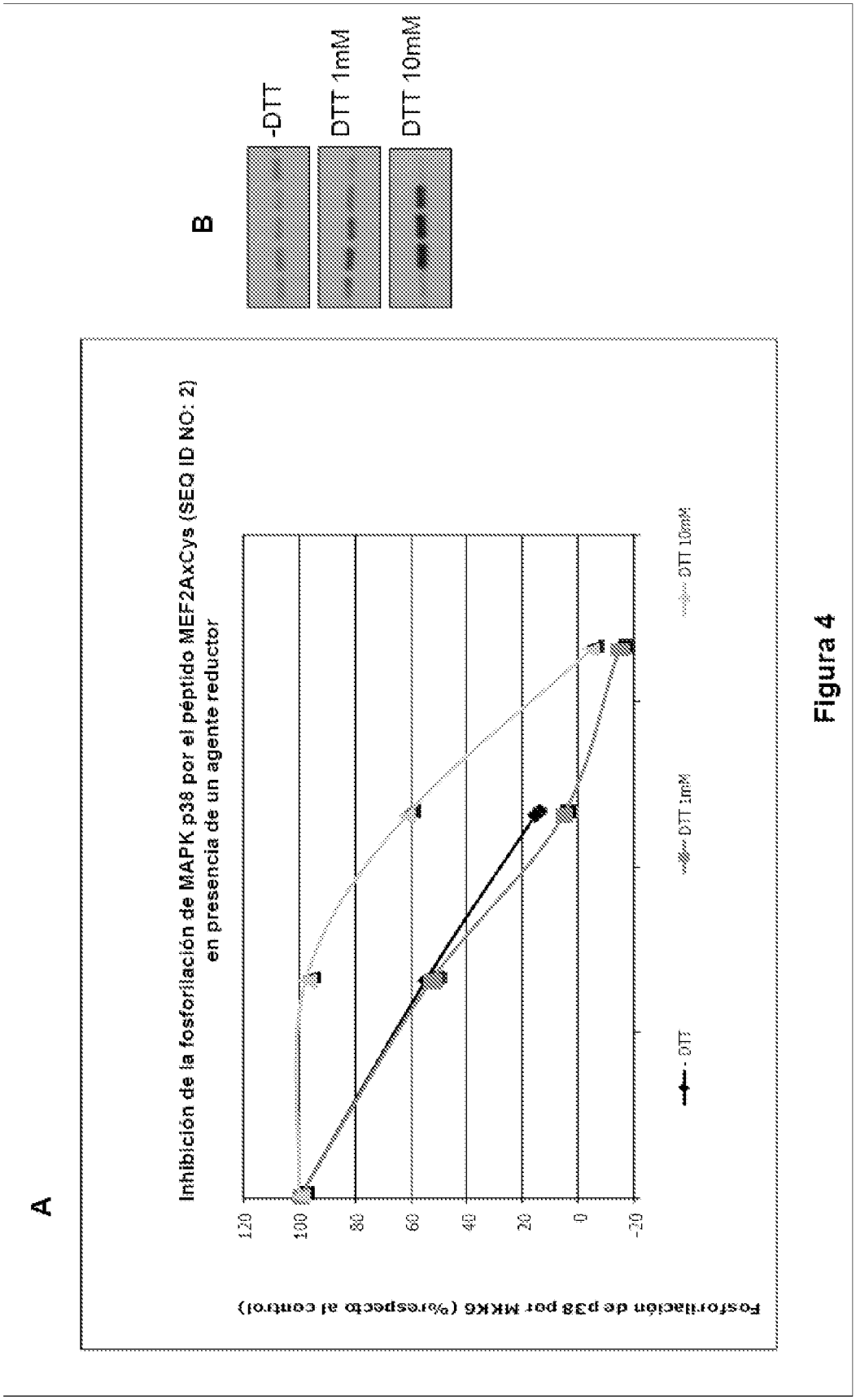

A
Inhibición de la fosforilación de MAPK p38 por el péptido MEF2AxCys (SEQ ID NO: 2)
en presencia de un agente reductor
Fosforilación de p38 por MKK6 (%respecto al control)
120
100
80
60
40
20
0
-20
- DTT
DTT 1mM
DTT 10mM
B
-DTT
DTT 1mM
DTT 10mM

Figura 4

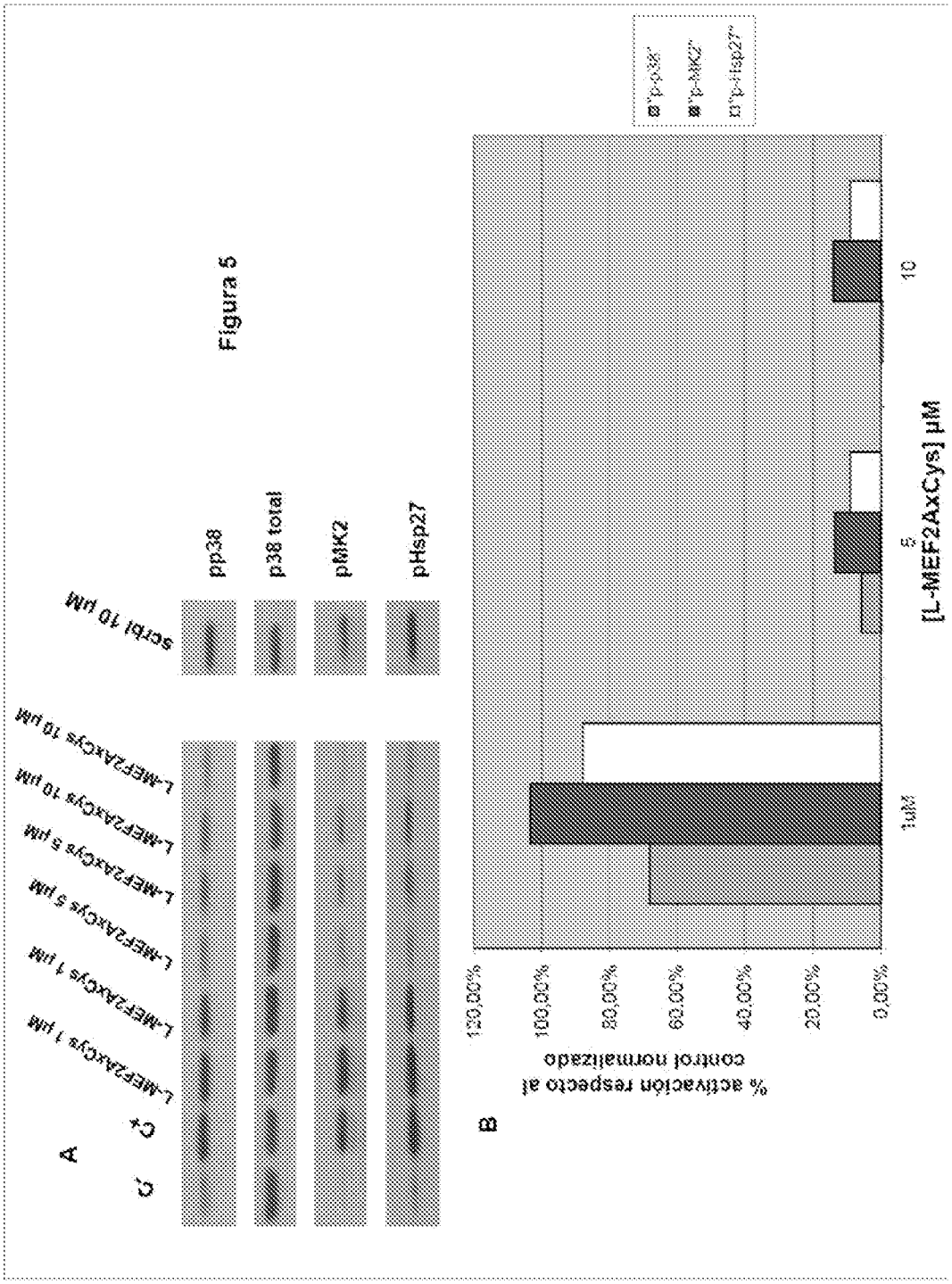

A
C-
C+
L-MEF2AxCys 1 µM
L-MEF2AxCys 1 µM
L-MEF2AxCys 5 µM
L-MEF2AxCys 5 µM
L-MEF2AxCys 10 µM
L-MEF2AxCys 10 µM
scrbl 10 µM
pp38
p38 total
pMK2
pHsp27
B
% activacion respecto al control normalizado
120,00%
100,00%
80,00%
60,00%
40,00%
20,00%
0,00%
1uM
5
10
[L-MEF2AxCys] µM
"p-p38"
"p-MK2"
"p-Hsp27"

Figura 5

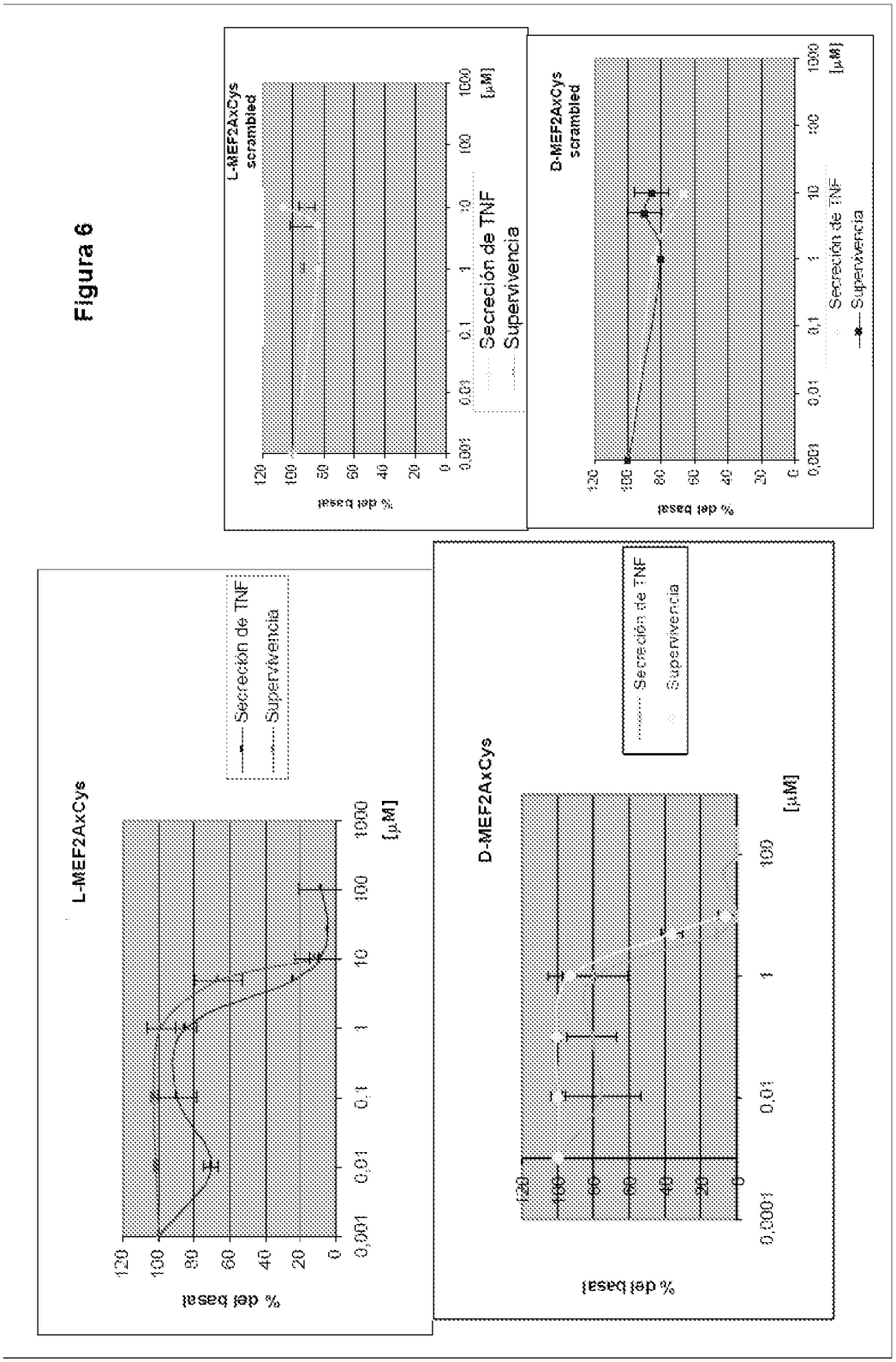
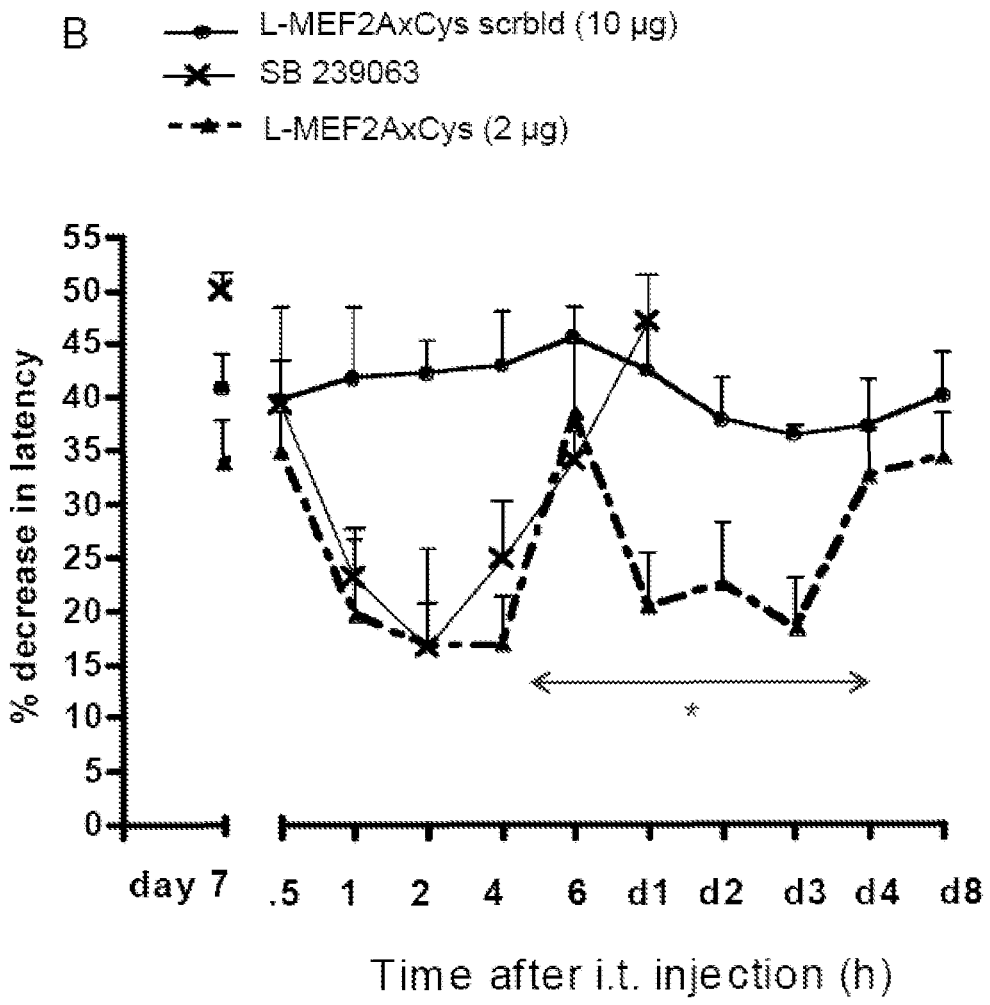


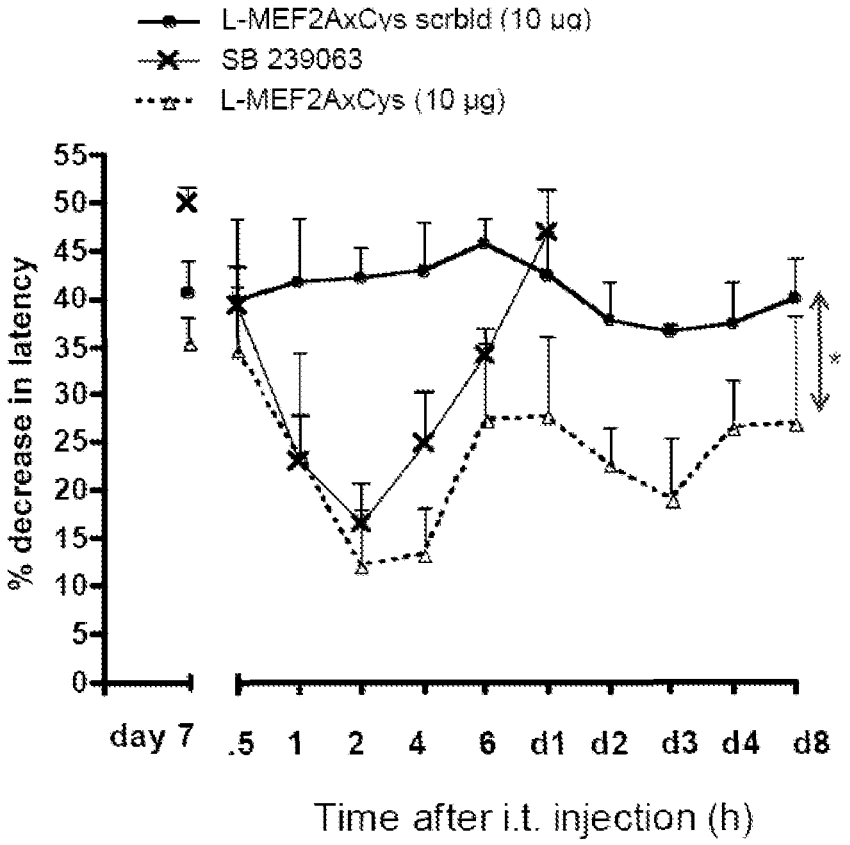
Figura 6
L-MEF2AxCys
Secreción de TNF
Supervivencia
% del basal
[µM]
L-MEF2AxCys scrambled
D-MEF2AxCys
D-MEF2AxCys scrambled

Figura 7



* Estos efectos no se observan con SB 239063

Figura 8



* Estos efectos no se observan con SB 239063

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Autónoma de Madrid

<120> Péptido inhibidor de p38 y aplicaciones.

<130> P5879ES00

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> p38 inhibitor peptide

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)..(1)
<223> /replace = Arg
/replace = Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (3)..(3)
<223> /replace = Asp
/replace = Glu

<220>
<221> VARIANT
<222> (4)..(4)
<223> /replace = Ile
/replace = Leu
/replace = Met
/replace = Val

<220>
<221> VARIANT
<222> (5)..(5)
<223> /replace = Arg
/replace = Lys

<220>
<221> VARIANT
<222> (6)..(8)
<223> /replace = Ile
/replace = Leu
/replace = Met
/replace = Val

<400> 1

Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Pro
1 5 10

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MEF2AxCys

<400> 2

Lys Pro Asp Leu Arg Val Val Ile Cys Pro
1 5 10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> pepMEF2A or MEF2A long

<400> 3

Arg Lys Pro Asp Leu Arg Val Val Ile Pro Pro Ser
1 5 10

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MEF2A short

<400> 4

Lys Pro Asp Leu Arg Val Val Ile Pro Pro
1 5 10

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MEF2AxArg

<400> 5

Lys Pro Asp Leu Arg Val Arg Ile Pro Pro
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MEF2A scrambled

<400> 6

```
Pro Asp Ile Lys Leu Pro Val Arg Pro Ser Arg Val
1               5                   10
```

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> sequence TAT

<400> 7

```
Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro
1               5                   10
```

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> MEF2AxCys scrambled

<400> 8

```
Val Ile Pro Lys Arg Pro Val Cys Leu Asp
1               5                   10
```

OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031673

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 12.11.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(51) **Int. Cl. :** ***C07K7/06*** (2006.01)
A61K38/08 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	(56) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CHUNG I C et al., "Crystal structuctures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b". Molecular Cell (2002), vol. 9, pág. 1241-1249. Todo el documento. Citado en la solicitud.	1-18
A	SHEN-HSI Y. et al., "Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors". Moleculas and Cellular Biology (1999), pág. 4208-4038. Todo el documento.	1-18

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

El presente informe ha sido realizado
☒ para todas las reivindicaciones ☐ para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe	Examinador	Página
27.03.2012	M. Hernández Cuellar	1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, A61K

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC,WPI, REGISTRY, MEDLINE, EMBASE, BIOSIS, CAPLUS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 27.03.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	1-18	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	1-18	**SI**
	Reivindicaciones		**NO**

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CHUNG I C et al., "Crystal structuctures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b". Molecular Cell (2002), vol. 9, pág. 1241-1249. Todo el documento. Citado en la solicitud.	
D02	SHEN-HSI Y. et al., "Targeting of p38 Mitogen-Activated Protein Kinases to MEF2 Transcription Factors". Moleculas and Cellular Biology (1999), pág.4208-4038. Todo el documento.	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se relaciona, en general, con un método para inhibir la activación o la actividad biológica de la proteín kinasa activada por mitógeno (MAPK) p38 y su empleo en el tratamiento de un sujeto que padece una enfermedad que puede ser aliviada mediante la inhibición de la activación o actividad biológica de dicha MAPK p38 , por ejemplo, una enfermedad inflamatoria o una enfermedad que cursa con dolor. La invención también se relaciona con dicho péptido, con composiciones farmacéuticas que comprenden dicho péptido y con sus aplicaciones.

El alcance del objeto correspondiente a las reivindicaciones 1-2, 6-18 excede sobremanera el alcance de la materia divulgada en la descripción. El objeto de la reivindicación 1 se extiende a 2048 posibles péptidos y en la descripción solo se aporta un ejemplo correspondiente a SEQ ID NO: 2. En este sentido, la búsqueda se ha limitado al péptido correspondiente a SEQ ID NO: 2.

El documento D01 consiste en un estudio de las estructuras cristalinas de los complejos que forma la kinasa MAP p38 en su sitio de anclaje con su sustrato nuclear MEF2A y el activador MKK3b. En la página 1244 describe 1244 el decapéptido pep-MEF2A que presenta la secuencia KPDLRVVIPP. La unión este péptido al sitio de anclaje induce cambios conformacionales y desorden en el loop de fosforilación. Según sus autores los cambios conformacionales inducidos por pep- MEF2A podrían quizá activar el enzima.

El documento D02 consiste en un estudio en el que se demuestra que los factores de trancripción MEF2 son fosforilados preferentemente por la familia de las p38 MAP kinasas. La eficiencia de la fosforilación in vitro y la activación transcripcional in vivo requiere la presencia del dominio D de anclaje de la kinasa en los factores MEF2. En la página 4032 se describe un ensayo de identificación de residuos importantes en el dominio D requeridos para una eficiente fosforilación por las MAPK p38 kinasa. Concretamente en la Figura 3 se aporta la secuencia correspondiente al dominio D (MNSRKPDLRVVIPPSSK) así como la secuencia de tres mutantes (M1, M2 y M3) en los que un par de residuos han sido sustituidos por alaninas. En concreto en el mutante M3 la sustitución se realiza sobre las dos prolinas. En ensayos realizados con proteínas de fusión mutantes se observa que estas, en comparación con la proteína salvaje ven reducida su capacidad de fosforilación y activación transcripcional. No obstante, según los autores, los residuos críticos responsables de la activación parecen ser indistinguibles.

1.- NOVEDAD

Ninguno de los documentos citados en el informe de búsqueda internacional describe un decapéptido idéntico al correspondiente a la SEQ ID NO : 2 de la invención (KPDLRVVICP). En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-18 cumplen el requisito de novedad establecido en el Art. 6.1 LP.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA

La invención plantea como problema técnico la provisión de un péptido inhibidor de la proteín kinasa activada por mitógeno (MAPK) p38. La solución es el decapéptido correspondiente a la SEQ ID NO 2.
El documento D01 se considera en estado de la técnica más próximo a la invención. En la página 1244 D02 describe el péptido pep-MEF2 que presenta la secuencia KPDLRVVIPP. La diferencia entre pep-MEF2 y en decapéptido de la invención SEQ ID NO 2 reside en el residuo 9 en el que una prolina de pep-MEF2 se ha sustituido por una cisteína en SEQ ID NO 2. El efecto técnico de esta diferencia consiste en que el péptido de la invención presenta una capacidad inhibitoria de la activación de MAPK 38 200 veces superior que pep-MEF2.
Por otra parte en el documento D02 se observa que el mutante M3 en el que las dos prolinas han sido sustituidas por dos alaninas ve reducida su capacidad de fosforilación y activación transcripcional. No obstante, según los autores, los residuos críticos responsables de la activación parecen ser indistinguibles.
Ninguno de los documentos del estado de la técnica tomados solos o en combinación permiten deducir de manera obvia que tal sustitución de prolina por cisteína sea responsable del elevado grado de inhibición de la fosforilación de MAPK p38. En consecuencia, en opinión de esta Oficina, las reivindicaciones 1-18 cumplen con el requisito de actividad inventiva establecido en el Art. 8.1 LP