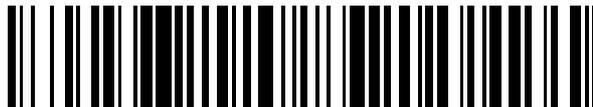


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 092**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.07.2007 E 07840538 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.06.2014 EP 2053915**

54 Título: **Péptidos para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios**

30 Prioridad:

26.07.2006 US 833239 P

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

26.08.2014

73 Titular/es:

**BIOMARCK PHARMACEUTICALS LTD. (100.0%)
4364 South Alston Ave.
Durham, North Carolina 27713, US**

72 Inventor/es:

PARIKH, INDU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 488 092 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 para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a péptidos de uso para atenuar (o inhibir o reducir) la liberación estimulada de mediadores de la inflamación a partir células inflamatorias durante la inflamación. La presente invención también se refiere al uso de estos péptidos para uso en la modulación un mecanismo de señalización intracelular que regula la secreción de mediadores de la inflamación por las células inflamatorias.

Antecedentes de la invención

10 Los leucocitos inflamatorios sintetizan un número de mediadores de la inflamación que están aislados intracelularmente y se almacenan en gránulos unidos a la membrana citoplásmica. Ejemplos de tales mediadores incluyen, pero no se limitan a, la mieloperoxidasa [MPO] en los neutrófilos (véase, por ejemplo Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89:3503-3521), la peroxidasa de eosinófilos [EPO] y la proteína básica principal [MBP] en los eosinófilos (véase, por ejemplo, Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:651-663), la lisozima en monocitos/macrófagos (véase, por ejemplo, Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Struebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992;52:173-182; and Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170:5276-5280), y granzima en células asesinas naturales (NK) y linfocitos citotóxicos (véase, por ejemplo, Bochan MR, Goebel WS, Brahmi Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. *Cell Immunol* 1995; 164:234 - 239; Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8:652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tarn YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10:369 - 383; y Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104: 183-190). Tales mediadores se liberan en zonas de lesión y contribuyen a la inflamación y a la reparación de tejidos tales como el pulmón y otras partes. Se sabe que los leucocitos liberan estos gránulos a través de un mecanismo de exocitosis (véase, por ejemplo, Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83:581-632; y Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932), pero las moléculas reguladoras y las rutas específicas que participan en el proceso de exocitosis no se han descrito completamente.

Varios estímulos exógenos pueden provocar la desgranulación de los leucocitos a través de una ruta que implica la activación de la proteína quinasa C y eventos de fosforilación posteriores (véase, por ejemplo, Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83:581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932; Smolen JE, Sandborg RR. Ca²⁺-induced secretion by electroporated human neutrophils: the roles of Ca²⁺, nucleotides and protein kinase C. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052:133-142; Niessen HW, Verhoeven AJ. Rol of protein phosphorylation in the degranulation of electroporated human neutrophils. *Biochem, Biophys. Acta* 1994 ; 1223:267-273; y Naucler C, Grinstein S, Sundler R., Tapper H. Signaling to localized degranulation in neutrophils adherent to immune complexes. *J Leukoc Biol.* 2002; 71: 701-710).

40 La proteína MARCKS (donde MARCKS tal y como se utiliza en la presente memoria significa "sustrato de quinasa C miristoilado rico en alanina"), es una diana ubicua de fosforilación de la proteína quinasa C (PKC), y se expresa abundantemente en los leucocitos (véase, por ejemplo, Aderem AA, Albert KA, Keum MM, Wang JK, Greengard P, Cohn ZA. Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* 1988; 332:362-364; Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem A. Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* 1991; 351:320-322; y Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem. MARCKS es una proteína de reticulación de actina filamentosa regulada por la proteína quinasa C y calcio-calmodulina. *Nature* 1992; 356:618-622. La proteína MARCKS está mecánicamente involucrada en un proceso de exocitosis de secreción de mucina por las células caliciformes que recubren las vías respiratorias (véase, por ejemplo, Li et al., *J. Biol. Ch.* em 2001; 276:40982-40990; y Singer et al., *Nat Med* 2004; 10: 193-196). La proteína MARCKS está miristoilada a través de un enlace amida en el aminoácido N-terminal en la secuencia de aminoácidos de la proteína MARCKS en la posición alfa-amino de la glicina que reside en el extremo N-terminal (es decir, en la posición 1) de la secuencia de aminoácidos. En las células epiteliales de las vías respiratorias, la región N-terminal miristoilada de MARCKS parece ser parte integral del proceso de secreción. Por extremo N-terminal de la proteína MARCKS se entiende el péptido de MANS que contiene miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1), que son L-aminoácidos. Además, los fragmentos peptídicos del péptido de MANS descritos en la presente memoria, también están compuestos preferiblemente de L-aminoácidos. El mecanismo parece implicar la unión de MARCKS, una proteína miristoilada, a las membranas de los gránulos intracelulares.

Se ha demostrado que un péptido miristoilado N-terminal del extremo N-terminal de MARCKS bloquea la secreción de mucina y la unión de MARCKS a las membranas del gránulo de mucina en células caliciformes (véase, por ejemplo, Singer et al., *Nat. Med.* 2004.; 10: 193-196). Este péptido contiene 24 aminoácidos de la proteína MARCKS comenzando por la glicina N-terminal de la proteína MARCKS que está miristoilada por medio de un enlace amida y que se conoce como la secuencia alfa-N-terminal miristoilada (MANS); es decir, miristoil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1), véase WO03/000027. También Vergeres et al., *J. Biochem.* 1998, 330; 5-11, describe que el resto de glicina N-terminal de las proteínas MARCKS está miristoilado a través de una reacción catalizada por miristoil CoA: proteína N-miristoil transferasa (NMT).

En las enfermedades inflamatorias, tales como asma, EPOC y bronquitis crónica; en enfermedades genéticas como la fibrosis quística; en las afecciones alérgicas (atopia, la inflamación alérgica); en las bronquiectasias; y en un número de enfermedades respiratorias agudas, infecciosas, como la neumonía, rinitis, gripe o el resfriado común, la artritis o las enfermedades autoinmunes, las células inflamatorias generalmente se encuentran o migran a las zonas de lesión o infección asociadas a estados de enfermedades inflamatorias, especialmente en o hacia el tracto o las vías respiratorias de los pacientes que sufren tales enfermedades. Estas células inflamatorias pueden contribuir en gran medida a la patología de las enfermedades a través del daño en el tejido causado por los mediadores de la inflamación liberados por estas células. Un ejemplo de tal daño o destrucción de tejidos por esta inflamación crónica se produce en pacientes con fibrosis quística donde los mediadores liberados por los neutrófilos (por ejemplo, mieloperoxidasa [MPO]) inducen la descamación del tejido epitelial de las vías respiratorias.

MARCKS, una proteína aproximadamente de 82 kD, tiene tres regiones conservadas evolutivamente (Aderem et al., *Nature* 1988; 332:362-364; Thelen et al., *Nature* 1991; 351:320-322; Hartwig et al., *Nature* 1992; 356:618-622; Seykora et al., *J Biol. Chem.* 1996; 271: 18797-18.802); un N-terminal, un dominio del sitio de fosforilación (o PSD), y un dominio 2 de homología múltiple de (MH2). El ADNc de MARCKS humano y la proteína son conocidos y reportados por Harlan et al., *J. Biol. Chem.* 1991, 266: 14399 (Nº de Acceso GenBank M68956) y también por Sakai et al., *Genomics* 1992, 14: 175. Estas secuencias también se proporcionan en el documento WO 00/50062. El extremo N-terminal, una secuencia de alfa-aminoácidos que comprende 24 restos de aminoácidos con un resto de ácido mirístico unido a través de un enlace amida al resto de glicina N-terminal está implicado en la unión de MARCKS a las membranas en las células (Seykora et al., *J Biol. Chem.* 1996; 271: 18797 hasta 18802) y, posiblemente, a la calmodulina (Matsubara et al., *J Biol. Chem.* 2003; 278:48898-48902). Esta secuencia de 24 aminoácidos se conoce como el péptido de MANS.

30 Compendio de la invención

La implicación de la proteína MARCKS en la liberación de mediadores de la inflamación por los gránulos de los leucocitos infiltrantes es relevante para la inflamación en las enfermedades de todos los tejidos y órganos, incluyendo enfermedades pulmonares caracterizadas por la inflamación de las vías respiratorias, como el asma, EPOC y la fibrosis quística. Sin embargo, la inflamación y la secreción de moco en las vías respiratorias son dos procesos separados e independientes (Li et al., *J Biol Chem* 2001; 276:40982-40990, Singer et al., *Nat Med* 2004; 10: 193-196). Mientras que la producción de moco y la secreción pueden estar provocadas por varios factores, incluyendo los mediadores liberados por las células inflamatorias, no existe un vínculo directo conocido por el cual el exceso de mucosidad causa inflamación.

El péptido de MANS puede desempeñar un papel en la reducción del índice y/o cantidad de gránulos o vesículas mediadoras inflamatorias liberados por los leucocitos inflamatorios.

Los péptidos derivados del extremo N-terminal de MARCKS, especialmente a partir de los 24 aminoácidos de la secuencia N-terminal, es decir, los fragmentos de péptidos activos contiguos derivados de dentro de la secuencia de aminoácidos 1-24 del extremo N-terminal de MARCKS que tienen una glicina en la posición 1, así como las amidas N-terminales de tales fragmentos, tales como las amidas del ácido acético N-terminal de tales fragmentos, y/o, así como amidas C-terminales de tales fragmentos, tales como las amidas C-terminales del amoniaco, pueden inhibir o reducir índice y/o la cantidad de mediadores de la inflamación liberados por los leucocitos inflamatorios. Dicha inhibición o reducción de la inhibición de la liberación relacionada con MARCKS de los mediadores de la inflamación por los leucocitos inflamatorios.

Los péptidos derivados del extremo N-terminal de MARCKS, especialmente a partir de los 24 aminoácidos de la secuencia N-terminal, es decir, los fragmentos de péptidos activos contiguos derivados de dentro de la secuencia de aminoácidos 1-24 de extremo N-terminal de MARCKS que tienen una glicina en la posición 1, así como las amidas N-terminales de tales fragmentos, tales como las amidas del ácido acético N-terminal de tales fragmentos, y/o, así como amidas C-terminales de tales fragmentos, tales como las amidas C-terminales del amoniaco, pueden inhibir o reducir índice y/o la cantidad de mediadores de la inflamación liberados por los leucocitos inflamatorios invención, tales como los identificados en la presente invención, por inhibición del proceso de desgranulación de los leucocitos inflamatorios.

Los péptidos MANS y los fragmentos activos de los mismos, y las amidas activas de tales fragmentos tal y como se describen en la presente memoria, pueden competir por la unión a la membrana de las células inflamatorias con la proteína MARCKS nativa para atenuar (disminuir o reducir) la liberación relacionada con MARCKS de los

mediadores de la inflamación por los gránulos o vesículas que contienen tales mediadores de la inflamación en dichas células inflamatorias.

5 Los tipos celulares de leucocitos y tipos de células modelo que secretan contenidos específicos de gránulos en respuesta a la activación de la PKC inducida por éster de forbol son útiles para la demostración in vitro de la eficacia de los péptidos para uso según esta invención y de los péptidos sustituidos (por ejemplo, alfa-N-amidas, amidas C-terminales y ésteres) para uso según esta invención.

La atenuación de la liberación de mediadores de la inflamación unidos a la membrana por los compuestos para uso según esta invención se puede demostrar utilizando líneas celulares de leucocitos humanos. Por ejemplo, los neutrófilos aislados de sangre humana se pueden utilizar para demostrar la atenuación o la inhibición de la liberación de mieloperoxidasa (MPO). La línea celular promielocítica humana HL-60 clon 15 se puede utilizar para demostrar la atenuación de la liberación o inhibición de la liberación o secreción de la peroxidasa eosinófila (EPO) por los compuestos y composiciones para uso según esta invención (véase, por ejemplo, Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. *Leuk Res* 1988; 12:679-686; Rosenberg HF, Ackerman S J, Tenen DG. Human eosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. *J Exp Med* 1989; 170:163-176; Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58:49-54.. , y Badewa AP, Hudson CE, Heimann A.S. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. *Soc. Exp. Biol. Med.* 2002; 227:645-651). La línea celular de leucemia monocítica U937 se puede utilizar para demostrar la atenuación de la liberación o inhibición de la liberación o secreción de lisozima por los compuestos y composiciones para uso según esta invención (véase, por ejemplo, Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Strebe M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52:173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J. Immunol* 2003; 170:5276-5280; y Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17:565-577). La línea de linfocitos de células asesinas naturales NK-92 se puede utilizar para demostrar la atenuación o la inhibición de la liberación de granzima por los compuestos y composiciones para uso según esta invención (véase, por ejemplo, Gong JH., Maki T, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8:652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10:369-383; y Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104:183-190). En un método in vitro para inhibir o atenuar la liberación de un mediador de la inflamación tales como los descritos en la presente memoria, cada uno de los tipos de células se incuban previamente con un compuesto peptídico o una composición de péptidos para uso según esta invención en un rango de concentraciones seguido por incubación de estas células con un estimulador de liberación de mediadores de la inflamación, como el éster de forbol. El porcentaje de inhibición de la liberación de un mediador de la inflamación se determina en comparación con la liberación del mediador en ausencia del compuesto de peptídico o composición de péptidos, en una lectura espectrofotométrica de la concentración del mediador liberado.

Para demostrar la importancia del posicionamiento relativo de la secuencia de aminoácidos en dichos péptidos, se comparó la capacidad relativa para inhibir o reducir la cantidad de mediador de la inflamación liberado por un péptido que es idéntico a la secuencia de 24 aminoácidos de la región N-terminal de la proteína MARCKS (es decir, la secuencia peptídica alfa-N-terminal miristoilada de MANS) con la capacidad de inhibir o reducir la cantidad de mediador de la inflamación liberado por un péptido que contiene los mismos 24 restos de aminoácidos presentes en MANS, pero secuenciado en un orden aleatorio (es decir, un péptido RNS, también denominado "secuencia de péptidos aleatoria del extremo N-terminal") con respecto al orden de secuencia de MANS. En cada uno de los tipos de células examinados, el péptido MANS, no así el péptido RNS, atenuaba la liberación de mediadores de la inflamación de una manera dependiente de la concentración durante un periodo de tiempo de 0,5-3,0 horas. Estos resultados sugieren que la posición relativa de los aminoácidos en la secuencia de péptidos que están en el orden en el que se encuentran en la proteína MARCKS, específicamente en su región N-terminal, y más concretamente los 24 restos de aminoácidos de la región N-terminal están involucrados en por lo menos una ruta intracelular relacionada con la inhibición de la desgranulación de los leucocitos.

La invención se refiere a la secuencia peptídica de 24 aminoácidos del extremo alfa-N-terminal, y a los fragmentos activos acetilados de la misma tal y como se definen en la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de afecciones inflamatorias.

55 De esta manera, en un primer aspecto de la invención se proporciona un péptido para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes, o síndrome del dolor, donde dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en:

60 acetil-GAQFSKTAAK (SEC ID NO: 106), acetil-AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEC ID NO: 11), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEC ID NO: 37), acetil-AKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 45), acetil-GAQFSKTAAKGE (SEC ID NO: 79), acetil-AAERPGEAAVA (SEC ID NO:91), acetil-GAQFSKTA (SEC ID NO: 121), acetil-TAAKGEEA (SEC ID NO: 143), acetil-RPGEAAVA (SEC ID

NO: 153), acetil- AKGE (SEC ID NO: 219), acetil-GAQFSKTAAGE (SEC ID NO: 239), acetil-GAQFSKTA AAA (SEC ID NO: 248), acetil-GAQFSKTA AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 79), acetil-AQFSKTA AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 93), acetil-QFSKTA AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 108), acetil-FSKTA AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 124), acetil-SKTA AKGENH₂ (SEC ID NO: 141), y acetil-AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 219). La invención se basa en la observación de que los péptidos de la invención inhiben la liberación de los mediadores de la inflamación por las células inflamatorias, cuyas rutas de estimulación implican a la proteína MARCKS sustrato de la proteína quinasa C (PKC) y la liberación del contenido intracelular de vesículas o gránulos. La inhibición de la liberación por exocitosis de por lo menos un mediador de inflamación de por lo menos una célula inflamatoria puede comprender poner en contacto la al menos una célula inflamatoria, que comprenda por lo menos un mediador de inflamación contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, con por lo menos un péptido del primer aspecto de la invención en una cantidad eficaz que reduzca la liberación del mediador de inflamación por célula inflamatoria en comparación con la liberación de un mediador de inflamación del mismo tipo de células inflamatorias que se produciría en ausencia de el al menos un péptido. En una forma de realización de la invención, el péptido del primer aspecto de la invención se encuentra en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la cantidad de mediador de inflamación y reducir la cantidad de por lo menos un mediador de inflamación liberado por lo menos por una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador de inflamación a por al menos una célula inflamatoria del mismo tipo que se produciría en ausencia de dicho péptido.

Como se emplea en esta memoria, un "fragmento activo" de una proteína MARCKS es aquel que afecta (inhibe o reduce) la liberación mediada por la proteína MARCKS, tal como la liberación mediada por la proteína MARCKS de un mediador de la inflamación. Un fragmento activo se puede seleccionar del grupo que consiste en GAQFSKTA AKG EAAA ERPGEAAV (SEC ID NO: 2); GAQFSKT AAKG EAAA ERPGEAA (SEC ID NO: 4); GAQFSKTA AKG E AAA ERPGE A (SEC ID NO: 7); GAQFSKTA AKG EAAA ERPGE (SEC ID N°: 11); GAQFSKTA AKG EAAA ERPGE (SEC ID NO: 16); GAQFSKTA AKG EAAA ERP (SEC ID NO: 22); GAQFSKT AAKG EAAA ER (SEC ID NO: 29); GAQFSKTA AKG EAAA E (SEC ID NO: 37); GAQFSKTA AKG EAAA (SEC ID NO: 46); GAQFSKTA AKG EAA (SEC ID NO: 56); GAQFSKTA AKG EA (SEC ID NO: 67); GAQFSKTA AKG E (SEC ID NO: 79); GAQFSKTA AKG (SEC ID NO: 92); GAQFSKTA AK (SEC ID NO: 106); GAQFSKTA A (SEC ID NO: 121); GAQFSKTA (SEC ID NO: 137); GAQFSKT (SEC ID NO: 154); GAQFSK (SEC ID NO: 172); GAQFS (SEC ID NO: 191) y GAQF (SEC ID N°: 211). Estos péptidos, en lugar de contener un resto miristoil en el extremo aminoácido N-terminal, o bien no contienen ningún resto químico o bien contienen un resto químico distinto del miristoil en el aminoácido N-terminal y/o un resto químico en el extremo aminoácido C-terminal, tal como un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal como se describe en la presente memoria. Los péptidos del primer aspecto de la invención están acetilados en el extremo N-terminal. La presencia del resto miristoil N-terminal hidrófobo en los péptidos MANS y de fragmentos miristoilados N-terminales de los mismos puede mejorar la compatibilidad con las membranas plasmáticas y presumiblemente la permeabilidad, y permitir potencialmente que los péptidos sean absorbidos por las células. La inserción de un grupo miristoil hidrófobo en una bicapa lipídica de la membrana puede proporcionar un coeficiente de partición o constante de asociación aparente con los lípidos de hasta $10^4 M^{-1}$ o una energía de enlace libre de Gibbs unitaria aproximadamente de 8 kcal/mol (véase, por ejemplo, Peitzsch, RM, y McLaughlin, S. 1993, Binding of acylated peptides and fatty acids to phospholipid vesicles: pertinence to myristoylated proteins. Biochemistry. 32: 10436-10443) que sea suficiente, por lo menos en parte, para permitir una compartimentación del péptido MANS y de fragmentos miristoilados del péptido MANS dentro de la membrana plasmática de una célula mientras que los grupos funcionales adicionales y sus interacciones dentro del péptido MANS (que está miristoilado) y dentro de los fragmentos miristoilados de péptido MANS pueden potenciar las permeabilidades de membrana relativas. Cada fragmentos pueden presentar coeficientes de partición y afinidades de membrana que son representativos de su respectivas estructuras. Los fragmentos se pueden preparar por métodos de síntesis de péptidos conocidos en la técnica, tales como síntesis de péptidos en fase sólida (véase, por ejemplo, los métodos descritos en Chan, Weng C. y White, Peter D. Eds., Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach, Oxford University Press, New York, New York (2000); y Lloyd-Williams, P. et al. Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (1997)) y purificarse por métodos conocidos en la técnica, tales como cromatografía líquida de alta presión. El peso molecular de cada péptido se puede confirmar por espectroscopia de masas mostrando cada uno un pico con una masa molecular apropiada. La eficacia de los péptidos individuales y de las combinaciones de los péptidos individuales (por ejemplo, combinaciones de 2 de los péptidos, combinaciones de 3 de los péptidos, combinaciones de 4 de los péptidos) en los métodos descrito en la presente memoria se puede determinar fácilmente sin excesiva experimentación utilizando los procedimientos descritos en los ejemplos descritos en la presente memoria. Una combinación preferida comprenderá dos de los péptidos; una relación molar preferida de los péptidos puede ser desde 50:50 (es decir, 1:1) para 99,99 a 0,01, proporción que puede determinarse fácilmente usando los procedimientos descritos en los ejemplos descritos en la presente memoria.

Preferiblemente, un péptido del primer aspecto de esta invención está contenido en una composición farmacéutica que es útil para bloquear la inflamación. La forma de administración generalmente se selecciona del grupo que consiste en la administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, inhalación y administración nasal u oral, en donde la administración pulmonar generalmente incluye bien un aerosol, un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, o un nebulizador.

- La administración de un péptido del primer aspecto de la invención o una composición que comprende un péptido del primer aspecto de la invención, tal como una composición farmacéutica del péptido, para uso humano o animal proporciona el péptido por lo menos al sitio dentro o sobre un tejido o a una capa que contiene el fluido en contacto con la superficie de un tejido en donde reside una célula granulocítica inflamatoria o al que una célula granulocítica inflamatoria invadirá, permitiendo así que el péptido contacte con la célula granulocítica inflamatoria. La administración se puede realizar a la primera aparición o a la primera detección de la inflamación o a la primera percepción de la inflamación en el ser humano o animal o al primer cambio perceptible en el nivel de inflamación en un ser humano o animal para reducir la cantidad de inflamación que de otra manera se produciría en ausencia del péptido. Adicionalmente, la administración se puede realizar durante una inflamación en curso de un tejido del ser humano o animal para reducir la cantidad de adicional la inflamación que se produciría en ausencia del péptido. Mientras que la cantidad y la frecuencia de dosis se puede determinar por evaluación clínica e ir en función de la enfermedad o de la fuente de la inflamación y el tamaño del tejido involucrado y la edad y tamaño del paciente, se prevé que la dosificación de una composición farmacéutica se puede repetir después de 3 a 8 horas, preferiblemente después de 6 a 8 horas después de la primera administración de la composición farmacéutica.
- Se puede proporcionar un péptido del primer aspecto de la invención en una cantidad que reduzca la cantidad de mediador de inflamación liberado y pueda reducir la cantidad de por lo menos un mediador de inflamación de por lo menos una célula inflamatoria del sujeto en comparación con lo que ocurriría en ausencia de dicho péptido. Como se emplea en esta memoria "reducir" generalmente significa una disminución de los efectos de la inflamación. Preferiblemente, la liberación de mediadores de la inflamación se inhibe o bloquea con los métodos descritos.
- El término "inhibir" significa una reducción en la cantidad de secreción de mediadores de la inflamación. El término "inhibir completamente" significa reducir a cero la cantidad de secreción de mediadores de la inflamación. El término "proceso de exocitosis" significa la exocitosis, es decir, un proceso de secreción celular o excreción en el que las sustancias contenidas en una vesícula, que reside dentro de una célula, se descargan de la célula por fusión de la membrana vesicular de la vesícula con membrana celular exterior. "Desgranulación" significa la liberación del contenido granular de la célula. El término "inhibición de la desgranulación" significa una reducción en la liberación de los mediadores de la inflamación contenidos en los gránulos de la célula inflamatoria. Por lo tanto, una cantidad de péptido inhibidora de la desgranulación es la cantidad de péptido que es suficiente para reducir la liberación de los mediadores de inflamación contenidos en los gránulos, en comparación con la liberación en ausencia de este mismo péptido.
- En el péptido de referencia, GAQFSKTAAKGEEAAERPGEEAAVA (SEC ID NO: 1), en la posición N-terminal del péptido de referencia, G está en la posición 1; adyacente a G en la posición 1 está A en la posición 2; adyacente a A en la posición 2 está Q en la posición 3; adyacente a Q en la posición 3 está F en la posición 4; adyacente a F en la posición 4 está S en la posición 5; adyacente a S en la posición 5 está K en la posición 6; adyacente a K en la posición 6 está T en la posición 7; adyacente a T en la posición 7 está A en la posición 8; adyacente a A en la posición 8 está A en la posición 9; adyacente a A en la posición 9 está K en la posición 10; adyacente a K en la posición 10 está G en la posición 11; adyacente a G en la posición 11 está E en la posición 12; adyacente a E en la posición 12 está A en la posición 13; adyacente a A en la posición 13 está A en la posición 14; adyacente a A en la posición 14 está A en la posición 15; adyacente a A en la posición 15 está E en la posición 16; adyacente a E en la posición 16 está R en la posición 17; adyacente a R en la posición 17 está P en la posición 18; adyacente a P en la posición 18 está G en la posición 19; adyacente a G en la posición 19 está E en la posición 20; adyacente a E en la posición 20 está A en la posición 21; adyacente a A en la posición 21 está A en la posición 22; adyacente a A en la posición 22 está V en la posición 23; y adyacente a V en la posición 23 está A en la posición 24, en donde la posición 24 es la posición C-terminal del péptido de referencia.
- Una "variante" de un péptido de referencia o una variante de un segmento de 4 a 23 aminoácidos de un péptido de referencia es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos que difiere de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia o a de la secuencia de aminoácidos del segmento péptidico de referencia, respectivamente, en por lo menos la posición de un aminoácido en el péptido de referencia o en la secuencia de aminoácidos del segmento del péptido de referencia, respectivamente, pero que retiene la actividad de inhibición de la mucina o del mucus, cuya actividad está normalmente entre 0,1 a 10 veces la actividad del péptido o del segmento de referencia, respectivamente, preferiblemente entre 0,2 a 6 veces la actividad del péptido o del segmento de referencia, respectivamente, más preferiblemente entre 0,3 a 5 veces la actividad del péptido o del segmento de referencia, respectivamente. Una "variante" de una secuencia de aminoácidos de referencia o una variante de un segmento de 4 a 23 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia es una secuencia de aminoácidos que difiere en por lo menos un aminoácido de la secuencia de aminoácidos de referencia o del segmento de la secuencia de aminoácidos de referencia, respectivamente, pero que tiene una secuencia de aminoácidos de un péptido que conserva la actividad de de inhibición mucina o de mucus del péptido o del segmento, respectivamente, codificada por la secuencia de aminoácidos de referencia, cuya actividad normalmente está entre 0,1 a 10 veces la actividad del péptido o segmento, respectivamente, de la secuencia de referencia, preferiblemente entre 0,2 a 6 veces la actividad del péptido o del segmento de la secuencia de referencia, respectivamente, más preferiblemente entre 0,3 a 5 veces la actividad del péptido o segmento de la secuencia de referencia, respectivamente. Un péptido variante de sustitución o una secuencia de aminoácidos variante de sustitución pueden variar (es decir, diferir) de un péptido de referencia o de una secuencia de aminoácidos de referencia en una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia; un péptido variante de delección o una secuencia de aminoácidos variante

de delección pueden variar (es decir, diferir) de un péptido de referencia o de una secuencia de aminoácidos de referencia en una o más delecciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de referencia; y un péptido variante de adición o una secuencia de aminoácidos variante de adición pueden variar (es decir, diferir) de una secuencia de péptidos o de una secuencia de aminoácidos de referencia en una o más adiciones de aminoácidos en la secuencia de referencia. Un péptido variante o secuencia de aminoácidos variante puede ser el resultado de una sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, sustitución de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o puede ser el resultado de una delección de uno o más aminoácidos (por ejemplo, delección de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o puede ser el resultado de una adición de uno o más aminoácidos (por ejemplo, adición de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de referencia, o una combinación de las mismas en cualquier orden. Una variante de sustitución del segmento peptídico de los aminoácidos 4 al 23 o una variante de sustitución de una secuencia de un segmento de los aminoácidos 4 al 23 puede variar (es decir, diferir) en relación con un segmento peptídico de referencia de los aminoácidos del 4 al 23 o de una secuencia de referencia del segmento de aminoácidos 4 al 23 en una o más sustituciones de aminoácidos en la secuencia de un segmento de aminoácidos de referencia; una variante de delección del segmento peptídico de los aminoácidos del 4 al 23 o una variante de delección de una secuencia del segmento de aminoácidos del 4 al 22 puede variar (es decir, diferir) en relación con el segmento peptídico de referencia del 5 al 23 o de una secuencia del segmento de aminoácidos de referencia del aminoácido 5 al 23 en una o más delecciones de aminoácidos en la secuencia de segmento de aminoácidos de referencia; y un péptido variante de adición de los aminoácidos 4 al 23 o secuencia de aminoácidos de una variante de adición de una secuencia de aminoácidos del 4 al 23 puede variar (es decir, diferir) en relación con una secuencia peptídica de referencia de los aminoácidos 4 al 22 o de una secuencia de aminoácidos de referencia de los aminoácidos 4 al 22 en una o más adiciones de aminoácidos en la secuencia de referencia. Un péptido variante de los aminoácidos 4 al 23 o una secuencia de aminoácidos variante de los aminoácidos 4 al 23 puede ser el resultado de una sustitución de uno o más aminoácidos (por ejemplo, sustitución de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 aminoácidos) en un segmento de 4 a 23 aminoácidos de una secuencia de aminoácidos de referencia, o puede ser el resultado de una delección de uno o más aminoácidos (por ejemplo, delección de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de aminoácidos de referencia más larga, o puede ser el resultado de una adición de uno o más aminoácidos (por ejemplo, adición de por lo menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 aminoácidos) en una secuencia de aminoácidos de referencia más corta, de una combinación de las mismas. Preferiblemente, una variante de una secuencia de péptidos o aminoácidos varía en relación con un péptido de referencia o en relación con un segmento de un péptido de referencia o en relación con una secuencia de aminoácidos de referencia o en relación con un segmento de una secuencia de aminoácidos de referencia, en por menos de 10 sustituciones de aminoácidos, delecciones, y/o adiciones; más preferiblemente en menos de 8 sustituciones de aminoácidos, delecciones, y/o adiciones; incluso más preferiblemente en menos de 6 sustituciones de aminoácidos, delecciones y/o adiciones; y aún más preferiblemente en menos de 5 sustituciones de aminoácidos, delecciones, y/o adiciones; y todavía incluso más preferiblemente en menos de 4 sustituciones de aminoácidos, delecciones, y/o adiciones. Más preferiblemente, la secuencia de aminoácidos variante difiere de un péptido de referencia o de un segmento de una secuencia de aminoácidos en uno o dos o tres aminoácidos.

"Identidad de secuencia" significa, con respecto a secuencias de aminoácidos de dos péptidos, el número de posiciones con aminoácidos idénticos dividido por el número de aminoácidos en la más corta de las dos secuencias.

"Sustancialmente idéntica" significa, con respecto a la comparación de secuencias de aminoácidos de dos péptidos o comparación de las secuencias de aminoácidos de dos segmentos peptídicos (por ejemplo, segmentos de una secuencia de aminoácidos del péptido de referencia), que la secuencia de aminoácidos de los péptidos o segmentos de péptidos tienen por lo menos 75% de identidad de secuencia, preferiblemente por lo menos 80% de identidad de secuencia, más preferiblemente por lo menos 90% de identidad de secuencia, y más preferiblemente por lo menos 95% de identidad de secuencia.

El término "péptido" tal como se utiliza en la presente memoria incluye el péptido así como las sales farmacéuticamente aceptables del péptido.

Un péptido "aislado", tal como se utiliza en la presente memoria, significa un péptido de origen natural que se ha separado o sustancialmente separado de los componentes celulares (por ejemplo, ácidos nucleicos y otros péptidos) que le acompañan de forma natural por purificación, síntesis recombinante, o síntesis química, y también abarca a péptidos sintetizados químicamente o recombinantes que no son de origen natural o que han sido purificados o sustancialmente purificados a partir de componentes celulares, materiales biológicos, precursores químicos u otros productos químicos.

Las siguientes abreviaturas de los aminoácidos de tres letras y de una letra se utilizan en todo el texto: Alanina: (Ala) A; Arginina: (Arg) R; Asparagina: (Asn) N; ácido aspártico: (Asp) D; Cisteína: (Cys) C; Glutamina: (Gln) Q; ácido glutámico: (Glu) E; Glicina: (Gly) G; Histidina: (His) H; Isoleucina: (Leu) I; Leucina: (Leu) L; Lisina: (Lys) K; Metionina: (Met) M; Fenilalanina: (Phe) F; Prolina: (Pro) P; Serina: (Ser) S; Treonina: (Thr) T; Triptófano: (Trp) W; Tirosina: (Tyr) Y; Valina: (Val) V. Otros símbolos de tres letras de aminoácidos útiles en la presente memoria incluyen, entre paréntesis. (Hyp) para hidroxiprolina, (Nle) para norleucina, (Orn) para ornitina (Pyr) para el ácido piroglutámico y (Sar) de sarcosina. Por convención, el amino final (o N-terminal) de un péptido de encuentra en el extremo izquierdo del péptido de una secuencia de aminoácidos escrita y el carboxilo final (o C-terminal) se encuentra en el extremo

derecho de una secuencia de aminoácidos escrita. La secuencia de aminoácidos de un péptido se puede escribir con símbolos de una sola letra para representar los aminoácidos que están unidos covalentemente por enlaces amidopeptídicos en el péptido.

5 Los péptidos del primer aspecto de esta invención se proporcionan para su uso en la prevención o reducción de la cantidad de inflamación de un tejido en un animal causada por los mediadores de la inflamación. También se pueden proporcionar para uso en la prevención o reducción de la cantidad de tejido dañado en un animal producido o causado por mediadores de la inflamación. En la presente memoria, un fragmento activa del péptido MANS se compone de por lo menos 4 aminoácidos contiguos y no más de 23 aminoácidos contiguos del péptido de MANS (SEC ID NO: 1). El término "fragmento activo" pretende abarcar aquellos fragmentos de los péptidos MANS que son capaces de prevenir o reducir la liberación de mediadores de la inflamación por una célula inflamatoria. La reducción de la liberación de mediadores de la inflamación por los péptidos del primer aspecto de esta invención puede variar de por lo menos 5% a por lo menos 99% de reducción, en comparación con un péptido de referencia, tal como el péptido MANS.

15 La tabla 1 contiene un listado de secuencias de aminoácidos en formato abreviado de una sola letra junto al número del péptido y al número de la secuencia SEC ID NO a la que corresponden respectivamente. La secuencia de aminoácidos del péptido de referencia (péptido MANS) se enumera como péptido 1. Las secuencias de aminoácidos de péptidos, incluyendo las del primer aspecto de la invención que tienen una secuencia de aminoácidos de 4 a 23 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de referencia se enumeran como péptidos 2-231, junto con la secuencia de aminoácidos de una secuencia N-terminal aleatoria (RNS) que comprende los aminoácidos del péptido MANS como el péptido 232. Las secuencias de aminoácidos de las variantes representativas de las secuencias de aminoácidos de los péptidos, que incluyen aquellas del primer aspecto de la invención también se enumeran como péptidos 233-245 y 247-251. Esta variante peptídica enumerada no pretende ser un grupo de péptidos limitante, sino que se presentan sólo como ejemplos representativos de variantes peptídicas. También se presenta una secuencia inversa de aminoácidos representativa (péptido 246) y una secuencia de aminoácidos aleatoria representativa del péptido (péptido 232). Las secuencias de aminoácidos inversas y aleatorias de la tabla no pretenden ser representativas de la invención.

25 La tabla 1 contiene un listado de los péptidos de esta invención y las respectivas secuencias de aminoácidos y los números de secuencia correspondientes SEC ID NO.

Tabla 1 Secuencias de Péptidos y Aminoácidos

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 1	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 1
péptido 2	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 2
péptido 3	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 3
péptido 4	GAQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 4
péptido 5	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 5
péptido 6	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 6
péptido 7	GAQrSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 7
péptido 8	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 8
péptido 9	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 9
péptido 10	FSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 10
péptido 11	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 11
péptido 12	AQFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 12
péptido 13	QFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 13
péptido 14	FSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 14
péptido 15	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 15
péptido 16	GAQFSKTAAKGEAAAERPG	SEC ID NO. 16
péptido 17	AQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 17
péptido 18	QFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 18
péptido 19	FSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 19

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 20	SKTAAKGEEAAERPGEAAV	SEC ID NO. 20
péptido 21	KTAAKGEEAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 21
péptido 22	GAQFSKTAAKGEEAAERP	SEC ID NO. 22
péptido 23	AQFSKTAAKGEEAAERPG	SEC ID NO. 23
péptido 24	QFSKTAAKGEEAAERPGE	SEC ID NO. 24
péptido 25	FSKTAAKGEEAAERPGEA	SEC ID NO. 25
péptido 26	SKTAAKGEEAAERPGEAA	SEC ID NO. 26
péptido 27	KTAAKGEEAAERPGEAAV	SEC ID NO. 27
péptido 28	TAAKGEEAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 28
péptido 29	GAQFSKTAAKGEEAAER	SEC ID NO. 29
péptido 30	AQFSKTAAKGEEAAERP	SEC ID NO. 30
péptido 31	QFSKTAAKGEEAAERPG	SEC ID NO. 31
péptido 32	FSKTAAKGEEAAERPGE	SEC ID NO. 32
péptido 33	SKTAAKGEEAAERPGEA	SEC ID NO. 33
péptido 34	KTAAKGEEAAERPGEAA	SEC ID NO. 34
péptido 35	TAAKGEEAAERPGEAAV	SEC ID NO. 35
péptido 36	AAKGEEAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 36
péptido 37	GAQFSKTAAKGEEAAE	SEC ID NO. 37
péptido 38	AQFSKTAAKGEEAAER	SEC ID NO. 38
péptido 39	QFSKTAAKGEEAAERP	SEC ID NO. 39
péptido 40	FSKTAAKGEEAAERPG	SEC ID NO. 40
péptido 41	SKTAAKGEEAAERPGE	SEC ID NO. 41
péptido 42	KTAAKGEEAAERPGEA	SEC ID NO. 42
péptido 43	TAAKGEEAAERPGEAA	SEC ID NO. 43
péptido 44	AAKGEEAAERPGEAAV	SEC ID NO. 44
péptido 45	AKGEEAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 45
péptido 46	GAQFSKTAAKGEEAAA	SEC ID NO. 46
péptido 47	AQFSKTAAKGEEAAE	SEC ID NO. 47
péptido 48	QFSKTAAKGEEAAER	SEC ID NO. 48
péptido 49	FSKTAAKGEEAAERP	SEC ID NO. 49
péptido 50	SKTAAKGEEAAERPG	SEC ID NO. 50
péptido 51	KTAAKGEEAAERPGE	SEC ID NO. 51
péptido 52	TAAKGEEAAERPGEA	SEC ID NO. 52
péptido 53	AAKGEEAAERPGEAA	SEC ID NO. 53
péptido 54	AKGEEAAERPGEAAV	SEC ID NO. 54
péptido 55	KGEEAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 55
péptido 56	GAQFSKTAAKGEEAA	SEC ID NO. 56
péptido 57	AQFSKTAAKGEEAAA	SEC ID NO. 57
péptido 58	QFSKTAAKGEEAAE	SEC ID NO. 58

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 59	FSKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 59
péptido 60	SKTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 60
péptido 61	KTAAKGEAAAERPG	SEC ID NO. 61
péptido 62	TAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 62
péptido 63	AAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 63
péptido 64	AKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 64
péptido 65	KGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 65
péptido 66	GEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 66
péptido 67	GAQFSKTAAKGEA	SEC ID NO. 67
péptido 68	AQFSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 68
péptido 69	QFSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 69
péptido 70	FSKTAAKGEAAAEE	SEC ID NO. 70
péptido 71	SKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 71
péptido 72	KTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 72
péptido 73	TAAKGEAAAERPG	SEC ID NO. 73
péptido 74	AAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 74
péptido 75	AKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 75
péptido 76	KGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 76
péptido 77	GEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 77
péptido 78	EAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 78
péptido 79	GAQFSKTAAKGE	SEC ID NO. 79
péptido 80	AQFSKTAAKGEA	SEC ID NO. 80
péptido 81	QFSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 81
péptido 82	FSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 82
péptido 83	SKTAAKGEAAAEE	SEC ID NO. 83
péptido 84	KTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 84
péptido 85	TAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 85
péptido 86	AAKGEAAAERPG	SEC ID NO. 86
péptido 87	AKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 87
péptido 88	KGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 88
péptido 89	GEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 89
péptido 90	EAAAERYGEAAV	SEC ID NO. 90
péptido 91	AAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 91
péptido 92	GAQFSKTAAKG	SEC ID NO. 92
péptido 93	AQFSKTAAKGE	SEC ID NO. 93
péptido 94	QFSKTAAKGEA	SEC ID NO. 94
péptido 95	FSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 95
péptido 96	SKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 96
péptido 97	KTAAKGEAAAEE	SEC ID NO. 97

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 98	TAAKGEEAAER	SEC ID NO. 98
péptido 99	AAKGEEAAERP	SEC ID NO. 99
péptido 100	AKGEEAAERPG	SEC ID NO. 100
péptido 101	KGEEAAERPGE	SEC ID NO. 101
péptido 102	GEAAERPGEA	SEC ID NO. 102
péptido 103	EAAERPGEAA	SEC ID NO. 103
péptido 104	AAERPGEAAV	SEC ID NO. 104
péptido 105	AAERPGEAAVA	SEC ID NO. 105
péptido 106	GAQFSKTAAK	SEC ID NO. 106
péptido 107	AQFSKTAAKG	SEC ID NO. 107
péptido 108	QFSKTAAKGE	SEC ID NO. 108
péptido 109	PSKTAAKGEA	SEC ID NO. 109
péptido 110	SKTAAKGEAA	SEC ID NO. 110
péptido 111	KTAAKGEEAA	SEC ID NO. 111
péptido 112	TAAKGEEAAE	SEC ID NO. 112
péptido 113	AAKGEEAAER	SEC ID NO. 113
péptido 114	AKGEEAAERP	SEC ID NO. 114
péptido 115	KGEEAAERPG	SEC ID NO. 115
péptido 116	GEAAERPGE	SEC ID NO. 116
péptido 117	EAAERPGEA	SEC ID NO. 117
péptido 118	AAERPGEAA	SEC ID NO. 118
péptido 119	AAERPGEAAV	SEC ID NO. 119
péptido 120	AERPGEAAVA	SEC ID NO. 120
péptido 121	GAQFSKTAA	SEC ID NO. 121
péptido 122	AQFSKTAAK	SEC ID NO. 122
péptido 123	QFSKTAAKG	SEC ID NO. 123
péptido 124	FSKTAAKGE	SEC ID NO. 124
péptido 125	SKTAAKGEA	SEC ID NO. 125
péptido 126	KTAAKGEAA	SEC ID NO. 126
péptido 127	TAAKGEEAA	SEC ID NO. 127
péptido 128	AAKGEEAAE	SEC ID NO. 128
péptido 129	AKGEEAAER	SEC ID NO. 129
péptido 130	KGEEAAERP	SEC ID NO. 130
péptido 131	GEAAERPG	SEC ID NO. 131
péptido 132	EAAERPGE	SEC ID NO. 132
péptido 133	AAERPGEA	SEC ID NO. 133
péptido 134	AAERPGEAA	SEC ID NO. 134
péptido 135	AERPGEAAV	SEC ID NO. 135
péptido 136	ERPGEAAVA	SEC ID NO. 136

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 137	GAQFSKTA	SEC ID NO. 137
péptido 138	AQFSKTAA	SEC ID NO. 138
péptido 139	QFSKTAAK	SEC ID NO. 139
péptido 140	FSKTAAKG	SEC ID NO. 140
péptido 141	SKTAAKGE	SEC ID NO. 141
péptido 142	KTAAKGEA	SEC ID NO. 142
péptido 143	TAAKGEAA	SEC ID NO. 143
péptido 144	AAKGEAAA	SEC ID NO. 144
péptido 145	AKGEAAA	SEC ID NO. 145
péptido 146	KGEAAAER	SEC ID NO. 146
péptido 147	GEAAAERP	SEC ID NO. 147
péptido 148	EAAAERPG	SEC ID NO. 148
péptido 149	AAAERPGE	SEC ID NO. 149
péptido 150	AAERPGEA	SEC ID NO. 150
péptido 151	AERPGEAA	SEC ID NO. 151
péptido 152	ERPGEAAV	SEC ID NO. 152
péptido 153	RPGEAAVA	SEC ID NO. 153
péptido 154	GAQFSKT	SEC ID NO. 154
péptido 155	AQFSKTA	SEC ID NO. 155
péptido 156	QFSKTAA	SEC ID NO. 156
péptido 157	FSKTAAK	SEC ID NO. 157
péptido 158	SKTAAKG	SEC ID NO. 158
péptido 159	KTAAKGE	SEC ID NO. 159
péptido 160	TAAKGEA	SEC ID NO. 160
péptido 161	AAKGEAA	SEC ID NO. 161
péptido 162	AKGEAAA	SEC ID NO. 162
péptido 163	KGEAAA	SEC ID NO. 163
péptido 164	GEAAAER	SEC ID NO. 164
péptido 165	EAAAERP	SEC ID NO. 165
péptido 166	AAAERPG	SEC ID NO. 166
péptido 167	AAERPGE	SEC ID NO. 167
péptido 168	AERPGEA	SEC ID NO. 168
péptido 169	ERPGEAA	SEC ID NO. 169
péptido 170	RPGEAAV	SEC ID NO. 170
péptido 171	PGEEAAVA	SEC ID NO. 171
péptido 172	GAQFSK	SEC ID NO. 172
péptido 173	AQFSKT	SEC ID NO. 173
péptido 174	QFSKTA	SEC ID NO. 174
péptido 175	FSKTAA	SEC ID NO. 175

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 176	SKTAAK	SEC ID NO. 176
péptido 177	KTAAKG	SEC ID NO. 177
péptido 178	TAAKGE	SEC ID NO. 178
péptido 179	AAKGEA	SEC ID NO. 179
péptido 180	AKGEAA	SEC ID NO. 180
péptido 181	KGEAAA	SEC ID NO. 181
péptido 182	GEAAAE	SEC ID NO. 182
péptido 183	EAAAER	SEC ID NO. 183
péptido 184	AAAERP	SEC ID NO. 184
péptido 185	AAERPG	SEC ID NO. 185
péptido 186	AERPGE	SEC ID NO. 186
péptido 187	ERPGEA	SEC ID NO. 187
péptido 188	RPGEAA	SEC ID NO. 188
péptido 189	PGEAAV	SEC ID NO. 189
péptido 190	GEAAVA	SEC ID NO. 190
péptido 191	GAQFS	SEC ID NO. 191
péptido 192	AQFSK	SEC ID NO. 192
péptido 193	QFSKT	SEC ID NO. 193
péptido 194	FSKTA	SEC ID NO. 194
péptido 195	SKTAA	SEC ID NO. 195
péptido 196	KTAAK	SEC ID NO. 196
péptido 197	TAAKG	SEC ID NO. 197
péptido 198	AAKGE	SEC ID NO. 198
péptido 199	AKGEA	SEC ID NO. 199
péptido 200	KGEAA	SEC ID NO. 200
péptido 201	GEAAA	SEC ID NO. 201
péptido 202	EAAAE	SEC ID NO. 202
péptido 203	AAAER	SEC ID NO. 203
péptido 204	AAERP	SEC ID NO. 204
péptido 205	AERPG	SEC ID NO. 205
péptido 206	ERPGE	SEC ID NO. 206
péptido 207	RPGEA	SEC ID NO. 207
péptido 208	PGEAA	SEC ID NO. 208
péptido 209	GEAAV	SEC ID NO. 209
péptido 210	EAAVA	SEC ID NO. 210
péptido 211	GAQF	SEC ID NO. 211
péptido 212	AQFS	SEC ID NO. 212
péptido 213	QFSK	SEC ID NO. 213
péptido 214	FSKT	SEC ID NO. 214

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 215	SKTA	SEC ID NO. 215
péptido 216	KTAA	SEC ID NO. 216
péptido 217	TAAK	SEC ID NO. 217
péptido 218	AAKG	SEC ID NO. 218
péptido 219	AKGE	SEC ID NO. 219
péptido 220	KGEA	SEC ID NO. 220
péptido 221	GEAA	SEC ID NO. 221
péptido 222	EAAA	SEC ID NO. 222
péptido 223	AAAE	SEC ID NO. 223
péptido 224	AAER	SEC ID NO. 224
péptido 225	AERP	SEC ID NO. 225
péptido 226	ERPG	SEC ID NO. 226
péptido 227	RPGE	SEC ID NO. 227
péptido 228	PGEA	SEC ID NO. 228
péptido 229	GEAA	SEC ID NO. 229
péptido 230	EAAV	SEC ID NO. 230
péptido 231	AAVA	SEC ID NO. 231
péptido 232	GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF	SEC ID NO. 232
péptido 233	GKQFSKTAAKGE	SEC ID NO. 233
péptido 234	GAQFSKTKAKGE	SEC ID NO. 234
péptido 235	GKQFSKTKAKGE	SEC ID NO. 235
péptido 236	GAQASKTAAK	SEC ID NO. 236
péptido 237	GAQASKTAAKGE	SEC ID NO. 237
péptido 238	GAEFSKTAAKGE	SEC ID NO. 238
péptido 239	GAQFSKTAAGE	SEC ID NO. 239
péptido 240	GAQFSKTAAKAE	SEC ID NO. 240
péptido 241	GAQFSKTAAKGA	SEC ID NO. 241
péptido 242	AAQFSKTAAK	SEC ID NO. 242
péptido 243	GAAFSKTAAK	SEC ID NO. 243
péptido 244	GAQFAKTAAK	SEC ID NO. 244
péptido 245	GAQFSATAAK	SEC ID NO. 245
péptido 246	KAATKSFQAG	SEC ID NO. 246
péptido 247	GAQFSKAAAK	SEC ID NO. 247
péptido 248	GAQFSKTAATA	SEC ID NO. 248
péptido 249	GAQFSATAAAA	SEC ID NO. 249
péptido 250	GAQASKTA	SEC ID NO. 250
péptido 251	AAGE	SEC ID NO. 251
péptido 252	GKASQFAKTA	SEC ID NO. 252

Una secuencia de aminoácidos de un péptido enumerado en la Tabla 1 se puede modificar químicamente. Por ejemplo, si una secuencia de aminoácidos de un péptido enumerado en la Tabla 1 se modifica químicamente en la amina N-terminal para formar una amida con un ácido carboxílico, al péptido resultante se le denomina a veces en la presente memoria como una combinación de un identificador para el ácido carboxílico como un prefijo unido por un guión al número del péptido. Por ejemplo, con respecto al péptido 79 como ejemplo, un péptido 79 miristoilado en el extremo N-terminal puede denominarse en la presente memoria "péptido 79-miristoilado o "péptido 79- myr 79"; un péptido 79 acetilado en el extremo N-terminal puede denominarse en la presente memoria "péptido 79-acetilo o "péptido 79-Ac". Una versión ciclada de péptido 79 puede denominarse "péptido 79-cíclico" o "péptido 79-cyc". También, por ejemplo, si una secuencia de aminoácidos de un péptido enumerado en la Tabla 1 se modifica químicamente en el grupo carboxílico C-terminal, por ejemplo, por una amina tal como el amoniaco para formar una amida C-terminal, el péptido resultante se denomina a veces en la presente memoria como una combinación de un identificador para el resto amino como un sufijo unido por un guión al número del péptido. Así, por ejemplo, una amida C-terminal del péptido 79 se puede denominar a veces como "péptido-NH₂". Cuando la amina N-terminal del péptido (por ejemplo, péptido 79) se modifica químicamente por medio de, por ejemplo, un grupo miristoilo y el grupo carboxílico C-terminal se modifica químicamente por medio de, por ejemplo, un grupo amonio para formar una amida como anteriormente, el péptido resultante puede denominarse a veces, utilizando tanto el prefijo y como el sufijo, como "myr-péptido79-NH₂".

Los péptidos del primer aspecto de la invención incluyen péptidos que consisten en secuencias de aminoácidos que contienen menos de 24 aminoácidos, y pueden consistir en los aminoácidos del 8 al 14, del 10 al 12, del 9 al 14, del 9 al 13, del 10 al 13, del 10 al 14, por lo menos el 9, por lo menos el 10, o similares. Los péptidos son normalmente cadenas lineales, pero pueden ser péptidos cíclicos también. Además, los péptidos pueden ser péptidos aislados.

Con respecto al péptido 1 (SEC ID NO: 1), la secuencia de referencia de 24 aminoácidos, un segmento continuo de 23 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de referencia se denomina a veces en la presente memoria 23-mer. Análogamente, un segmento continuo de 22 aminoácidos de la secuencia de referencia se denomina a veces en la presente memoria 22-meros; una secuencia de 21 aminoácidos 21-meros; una secuencia de 20 aminoácidos 20-meros; una secuencia de 19 aminoácidos 19-meros; una secuencia de 18 aminoácidos 18-meros; una secuencia de 17 aminoácidos 17-meros; una secuencia de 16 aminoácidos 16-meros; una secuencia de 15 aminoácidos 15-meros; una secuencia de 14 aminoácidos 14-meros; una secuencia de 13 aminoácidos 13-meros; una secuencia de 12 aminoácidos 12-meros; una secuencia de 11 aminoácidos 11-meros; una secuencia de 10 aminoácidos 10-meros; una secuencia de 9 aminoácidos 9-meros; una secuencia de 8 aminoácidos 8-meros; una secuencia de 7 aminoácidos 7-meros; una secuencia de 6 aminoácidos 6-meros; una secuencia de 5 aminoácidos 5-meros; y una secuencia de ácido 4 amino 4-meros. Cualquiera de estas secuencias de aminoácidos "4 a 23-meros", que son péptidos (a veces en la presente memoria denominados H₂N-péptido-COOH), se pueden modificar químicamente de manera independiente, por ejemplo, por modificación química, pudiéndose seleccionar dicha modificación química del grupo que consiste en (i) formación de amida en el grupo amino N-terminal (H₂N-péptido-), con como, por ejemplo, un C1 o preferiblemente con un C2 (ácido acético) en el ácido carboxílico C22; (ii) la formación de una amida en el grupo carboxílico C-terminal (-péptido-COOH), con como, por ejemplo, amoniaco o con una amina primaria o secundaria C1 a C22; y (iii) una combinación de los mismos.

Los péptidos derivados del péptido de referencia pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 4 al 23 de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), en la que la variante se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante de adición, y combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 8 al 14 de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), en la que la variante se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante adición, y combinaciones de las mismas. Además en otras realizaciones, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 10 al 12 de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la secuencia definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), en la que la variante se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante adición, y combinaciones de las mismas. En otras realizaciones, los péptidos tienen una secuencia de aminoácidos que tiene por lo menos el 9, por lo menos el 10, del 9 al 14, del 9 al 13, del 10 al 13, del 10 al 14, o aminoácidos contiguos similares a los de la secuencia de referencia, péptido 1; una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la misma; o una variante de la misma, en la que la variante se selecciona de entre el grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante de adición, y combinaciones de las mismas. Como se explica más adelante, uno o más de los aminoácidos de los péptidos (por ejemplo, los aminoácidos N-terminales y/o C-terminales) se pueden modificar químicamente independientemente de manera opcional; en algunas realizaciones, uno o más aminoácidos de un péptido estará modificado químicamente, mientras que en otras realizaciones ninguno de los aminoácidos del péptido estará modificado químicamente. La modificación puede ocurrir en el grupo amina (-NH₂) de aminoácido N-terminal del péptido o del segmento del péptido (en el que grupo

amina formaría un enlace amido peptídico si está presente internamente dentro de una secuencia peptídica en lugar de en la posición N-terminal). La modificación preferida puede ocurrir en el (-COOH) del aminoácido C-terminal del péptido o del segmento peptídico (en el que el grupo carboxilo formaría un enlace amido peptídico si está presente internamente dentro de una secuencia peptídica en lugar de en la posición C-terminal). La modificación puede ocurrir tanto en la amina N-terminal (-NH₂) como en el grupo carboxílico C-terminal (-COOH).

La secuencia de aminoácidos del péptido de un péptido derivado de un péptido de referencia se inicia a partir del aminoácido N-terminal de la secuencia del péptido de referencia 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 4 al 23 de la secuencia de referencia del péptido 1, en la que la secuencia de aminoácidos comienza a partir del aminoácido N-terminal de la secuencia de referencia (es decir, péptido 2, péptido 4, péptido 7, péptido 11, péptido 16, péptido 22, péptido 29, péptido 37, péptido 46, péptido 56, péptido 67, péptido 79, péptido 92, péptido 106, péptido 121, péptido 137, péptido 154, péptido 172, péptido 191, o péptido 211); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). Estos péptidos no contienen ningún resto químico o tienen un resto químico en la glicina N-terminal distinto de un grupo miristoilo. Preferiblemente, el resto químico es un grupo acilo, en forma de un enlace amida, tal como el de los péptidos de la invención, un grupo acetilo, o un grupo alquilo.

La secuencia de aminoácidos del péptido de un péptido derivado de un péptido de referencia se termina en el aminoácido C-terminal de la secuencia del péptido de referencia 1. Por ejemplo, estos péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 4 al 23 de la secuencia de referencia del péptido 1, en donde la secuencia de aminoácidos termina en el aminoácido C-terminal de la secuencia de referencia (es decir, péptido 3, péptido 6, péptido 10, péptido 15, péptido 21, péptido 28, péptido 36, péptido 45, péptido 55, péptido 66, péptido 78, péptido 91, péptido 105, péptido 120, péptido 136, péptido 153, péptido 171, péptido 190, péptido 210, o el péptido 231); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a).

La secuencia de aminoácidos de un péptido derivado de un péptido de referencia puede no comenzar en el aminoácido N-terminal de la secuencia de referencia, péptido 1, (SEC ID NO: 1), sino que puede comenzar en el aminoácido en la posición 2 hasta el aminoácido en la posición 21 de la secuencia de referencia del péptido 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 4 al 23 de la secuencia de referencia del péptido 1, en la que la secuencia de aminoácidos comienza por cualquier aminoácido entre la posición 2 hasta la posición 21 de la secuencia de referencia. Estos péptidos pueden ser de una longitud de entre 4 y 23 aminoácidos contiguos y pueden representar péptidos en el medio de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a). Estos péptidos se describen en las Tablas 1 o 2. Estos péptidos pueden no contener ningún resto químico unido covalentemente o un resto químico en el aminoácido N-terminal que no sea la glicina N-terminal de o equivalente a la glicina N-terminal de la secuencia de aminoácidos SEC ID NO. 1. Preferiblemente, el resto químico es un grupo acilo, tal como, en los péptidos de la presente invención, un grupo acetilo o un grupo miristoilo, en forma de un enlace amida, o un grupo alquilo.

Las secuencias de aminoácidos de péptidos que son útiles para inhibir la hipersecreción de mucina en un mamífero, y que son útiles para reducir la cantidad de la hipersecreción de mucina en un mamífero, y que son útiles en los métodos de inhibición de la hipersecreción de mucina y en los métodos de reducción de la hipersecreción de mucina incluyen secuencias de aminoácidos de péptidos aislados y secuencias de aminoácidos de péptidos que contienen opcionalmente grupos modificados químicamente en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la presente invención, tales secuencias de aminoácidos de péptidos se seleccionan del grupo que consiste en 23-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 23 aminoácidos): el péptido 2; y el péptido 3; los 22-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 22 aminoácidos): el péptido 4; el péptido 5; y el péptido 6; los 21-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 21 aminoácidos): el péptido 7; el péptido 8; el péptido 9; y el péptido 10; los 20-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 20 aminoácidos): el péptido 11; el péptido 12; el péptido 13; el péptido 14; y el péptido 15; los 19-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 19 aminoácidos): el péptido 16; el péptido 17; el péptido 18; el péptido 19; el péptido 20; y el péptido 21; los 18-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 18 aminoácidos): el péptido 22; el péptido 23; el péptido 25; el péptido 26; el péptido 27; y el péptido 28; los 17-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 17 aminoácidos): el péptido 29; el péptido 30; el péptido 31; el péptido 32; el péptido 33; el péptido 34; el péptido 35; y el péptido 36; los 16-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 16 aminoácidos): el péptido 37; el péptido 38; el péptido 39; el péptido 40; el péptido 41; el péptido 42; el péptido 43; el péptido 44; y el péptido 45; los 15-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 15 aminoácidos): el péptido 46; el péptido 47; el péptido 48; el péptido 49; el péptido 50; el péptido 51; el péptido 52; el péptido 53; el péptido 54; y el péptido 55; los 14-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 14 aminoácidos): el péptido 56; el péptido 57; el péptido 58; el péptido 59; el péptido 60; el péptido 61; el péptido 62; el péptido 63; el péptido 64; el péptido 65; y el péptido 66; los 13-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 13 aminoácidos): el péptido 67; el péptido 68; el péptido 69; el péptido 70; el péptido 71; el péptido 72; el péptido 73; el péptido 74; el péptido 75; el péptido 76; el péptido 77; y el péptido 78; los 12-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 12 aminoácidos): el péptido 79; el péptido 80; el péptido 81; el péptido

82; el péptido 83; el péptido 84; el péptido 85; el péptido 86; el péptido 87; el péptido 88; el péptido 89; el péptido 90; y el péptido 91; los 11-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de ácido 1 amino 1): el péptido 92; el péptido 93; el péptido 94; el péptido 95; el péptido 96; el péptido 97; el péptido 98; el péptido 99; el péptido 100; el péptido 101; el péptido 102; el péptido 103; el péptido 104; y el péptido 105; los 10-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 10 aminoácidos): el péptido 106; el péptido 107; el péptido 108; el péptido 109; el péptido 110; el péptido 111; el péptido 112; el péptido 113; el péptido 114; el péptido 115; el péptido 116; el péptido 117; el péptido 118; péptido 119; y el péptido 120; los 9-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 9 aminoácidos): el péptido 121; el péptido 122; el péptido 123; el péptido 124; el péptido 125; el péptido 126; el péptido 127; el péptido 128; el péptido 129; el péptido 130; el péptido 131; el péptido 132; el péptido 133; el péptido 134; el péptido 135; y el péptido 136; los 8-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 8 aminoácidos): el péptido 137; el péptido 138; el péptido 139; el péptido 140; el péptido 141; el péptido 142; el péptido 143; el péptido 144; el péptido 145; el péptido 146; el péptido 147; el péptido 148; el péptido 149; el péptido 150; el péptido 151; el péptido 152; y el péptido 153; los 7-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 7 aminoácidos): el péptido 154; el péptido 155; el péptido 156; el péptido 157; el péptido 158; el péptido 159; el péptido 160; el péptido 161; el péptido 162; el péptido 163; el péptido 164; el péptido 165; el péptido 166; el péptido 167; el péptido 168; el péptido 169; el péptido 170; y el péptido 171; los 6-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 6 aminoácidos): el péptido 172; el péptido 173; el péptido 174; el péptido 175; el péptido 176; el péptido 177; el péptido 178; el péptido 179; el péptido 180; el péptido 181; el péptido 182; el péptido 183; el péptido 184; el péptido 185; el péptido 186; el péptido 187; el péptido 188; el péptido 189; y el péptido 190; los 5-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 5 aminoácidos): el péptido 191; el péptido 192; el péptido 193; el péptido 194; el péptido 195; el péptido 196; el péptido 197; el péptido 198; el péptido 199; el péptido 200; el péptido 201; el péptido 202; el péptido 203; el péptido 204; el péptido 205; el péptido 206; el péptido 207; el péptido 208; el péptido 209; y el péptido 210; y los 4-meros (es decir, péptidos que tienen una secuencia de 4 aminoácidos): el péptido 211; el péptido 212; el péptido 213; el péptido 214; el péptido 215; el péptido 216; el péptido 217; el péptido 218; el péptido 219; el péptido 220; el péptido 221; el péptido 222; el péptido 223; el péptido 224; el péptido 225; el péptido 226; el péptido 227; el péptido 228; el péptido 229; péptido 230; y el péptido 231.

Las secuencias de aminoácidos de péptidos aislados y de péptidos químicamente modificados en los extremos N-terminal y/o C-terminal incluyen aquellos que se seleccionan del grupo que consiste en los 23-meros: el péptido 2; y el péptido 3; los 22-meros: el péptido 4; el péptido 5; y el péptido 6; los 21-meros: el péptido 7; el péptido 8; el péptido 9; y el péptido 10; los 20-meros: el péptido 11; el péptido 12; el péptido 13; el péptido 14; y el péptido 15; los 19-meros: el péptido 16; el péptido 17; el péptido 18; el péptido 19; el péptido 20; y el péptido 21; los 18-meros: el péptido 22; el péptido 23; el péptido 24; el péptido 25; el péptido 26; péptido 27; y el péptido 28; los 17-meros: el péptido 29; el péptido 30; el péptido 31; el péptido 32; el péptido 33; el péptido 34; el péptido 35; 36 y el péptido 37; los 16-meros: el péptido 37; el péptido 38; el péptido 39; el péptido 40; el péptido 41; el péptido 42; el péptido 43; péptido 44; y el péptido 45; los 15-meros: el péptido 46; el péptido 47; el péptido 48; el péptido 49; el péptido 50; el péptido 51; el péptido 52; péptido 53; y el péptido 54; los 14-meros: el péptido 56; el péptido 57; el péptido 58; el péptido 59; el péptido 60; el péptido 61; el péptido 62; el péptido 63; y el péptido 64; los 13-meros: el péptido 67; el péptido 68; el péptido 69; el péptido 70; el péptido 71; el péptido 72; el péptido 73; el péptido 74; y el péptido 75; los 12-meros: el péptido 79; el péptido 80; el péptido 81; el péptido 82; el péptido 83; el péptido 84; el péptido 85; péptido 86; y el péptido 87; los 11-meros: el péptido 92; el péptido 93; el péptido 94; el péptido 95; el péptido 96; el péptido 97; el péptido 98; péptido 99; y el péptido 100; los 10-meros: el péptido 106; el péptido 107; el péptido 108; el péptido 109; el péptido 110; el péptido 111; el péptido 112; el péptido 113; y el péptido 114; los 9-meros: el péptido 122; el péptido 123; el péptido 124; el péptido 125; el péptido 126; el péptido 127; péptido 128; y el péptido 129; los 8-meros: el péptido 139; el péptido 140; el péptido 141; el péptido 142; el péptido 143; el péptido 144; y el péptido 145; los 7-meros: el péptido 157; el péptido 158; el péptido 159; el péptido 160; el péptido 161; y el péptido 162; los 6-meros: el péptido 176; el péptido 177; el péptido 178; el péptido 179; y el péptido 180; los 5-meros: el péptido 196; el péptido 197; el péptido 198; y el péptido 199; y los 4-meros: el péptido 217; y el péptido 219.

Las secuencias de aminoácidos de péptidos aislados y de péptidos químicamente modificados en el extremo N-terminal y/o C-terminal incluyen aquellos que se seleccionan del grupo que consiste en los 23-meros: péptido 2; y el péptido 3; los 22-meros: el péptido 4; el péptido 5; y el péptido 6; los 21-meros: el péptido 7; el péptido 8; el péptido 9; y el péptido 10; los 20-meros: el péptido 11; el péptido 12; el péptido 13; el péptido 14; y el péptido 15; los 19-meros: el péptido 16; el péptido 17; el péptido 18; el péptido 19; el péptido 20; y el péptido 21; los 18-meros: el péptido 22; el péptido 23; el péptido 24; el péptido 25; el péptido 26; péptido 27; y el péptido 28; los 17-meros: el péptido 29; el péptido 30; el péptido 31; el péptido 32; el péptido 33; el péptido 34; péptido 35; y el péptido 36; los 16-meros: el péptido 37; el péptido 38; el péptido 39; el péptido 40; el péptido 41; el péptido 42; el péptido 43; el péptido 44; y el péptido 45; los 15-meros: el péptido 46; el péptido 47; el péptido 48; el péptido 49; el péptido 50; el péptido 51; el péptido 52; el péptido 53; y el péptido 54; los 14-meros: el péptido 56; el péptido 57; el péptido 58; el péptido 59; el péptido 60; el péptido 61; el péptido 62; el péptido 63; y el péptido 64; los 13-meros: el péptido 67; el péptido 68; el péptido 69; el péptido 70; el péptido 71; el péptido 72; el péptido 73; el péptido 74; el péptido 80; el péptido 81; el péptido 82; el péptido 83; el péptido 84; el péptido 85; el péptido 86; y el péptido 87; los 11-meros: el péptido 92; el péptido 93; el péptido 94; el péptido 95; el péptido 96; el péptido 97; el péptido 98; el péptido 99; y el péptido 100; los 10-meros: el péptido 106; el péptido 108; el péptido 109; el péptido 110; el péptido 111; el péptido 112; el péptido 113; y el péptido 114; los 9-meros: el péptido 124; el péptido 125; el péptido 126; el péptido 127; el péptido 128; y el péptido 129; los 8-meros: el péptido 141; el péptido 142; el péptido 143; el péptido 144; y el péptido 145; los 7-

meros: el péptido 159; el péptido 160; el péptido 161; y el péptido 162; los 6-meros: el péptido 178; el péptido 179; y el péptido 180; los 5-meros: el péptido 198; y el péptido 199; y el 4-mer: el péptido 219.

5 Las secuencias de aminoácidos de un péptido, por ejemplo en un primer aspecto de la invención, pueden incluir los restos contiguos A, K, G, y E como en el péptido 219 de la secuencia de referencia del péptido 1. Por ejemplo, los péptidos pueden tener una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 4 al 23 de la secuencia de péptido de referencia 1, en donde la secuencia de aminoácidos del péptido incluye los restos contiguos A, K, G, y E como en péptido 219 del péptido de referencia 1 (por ejemplo, el péptido 219, el péptido 45, el péptido 79, el péptido 67, el péptido 80, etc.); (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a).

10 Los ejemplos de segmentos peptídicos que contienen la secuencia de aminoácidos AKGE de la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia, péptido 1, incluyen (a) los 23-meros: el péptido 2; y el péptido 3; los 22-meros: el péptido 4; el péptido 5; y el péptido 6; los 11-meros: el péptido 7; el péptido 8; el péptido 9; y el péptido 10; los 20-meros: el péptido 11; el péptido 12; el péptido 13; el péptido 14; y el péptido 15; los 19-meros: el péptido 16; el péptido 17; el péptido 18; el péptido 19; el péptido 20; y el péptido 21; los 18-meros: el péptido 22; el péptido 23; el péptido 24; el péptido 25; el péptido 26; péptido 27; y el péptido 28; los 17-meros: el péptido 29; el péptido 30; el péptido 31; el péptido 32; el péptido 33; el péptido 34; péptido 35; y el péptido 36; los 16-meros: el péptido 37; el péptido 38; el péptido 39; el péptido 40; el péptido 41; el péptido 42; el péptido 43; el péptido 44; y el péptido 45; los 15-meros: el péptido 46; el péptido 47; el péptido 48; el péptido 49; el péptido 50; el péptido 51; el péptido 52; el péptido 53; y el péptido 54; los 14-meros: el péptido 56; el péptido 57; el péptido 58; el péptido 59; el péptido 60; el péptido 61; el péptido 62; el péptido 63; y el péptido 64; los 13-meros: el péptido 67; el péptido 68; el péptido 69; el péptido 70; el péptido 71; el péptido 72; el péptido 73; péptido 74; y el péptido 75; los 12-meros: el péptido 79; el péptido 80; el péptido 81; el péptido 82; el péptido 83; el péptido 84; el péptido 85; el péptido 86; y el péptido 87; los 11-meros: el péptido 93; el péptido 94; el péptido 95; el péptido 96; el péptido 97; el péptido 98; el péptido 99; y el péptido 100; los 10-meros: el péptido 108; el péptido 109; el péptido 110; el péptido 111; el péptido 112; el péptido 113; y el péptido 114; los 9-meros: el péptido 124; el péptido 125; el péptido 126; el péptido 127; el péptido 128; y el péptido 129; los 8-meros: el péptido 141; el péptido 142; el péptido 143; el péptido 144; y el péptido 145; los 7-meros: el péptido 159; el péptido 160; el péptido 161; y el péptido 162; los 6-meros: el péptido 178; el péptido 179; y el péptido 180; los 5-meros: el péptido 198; y el péptido 199; y el 4-mer: el péptido 219, (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), en la que la variante se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante de adición, y combinaciones de las mismas, en donde el segmento comprende o consiste en los aminoácidos contiguos del 4 al 23.

35 Las secuencias de péptidos incluyen aquellas que tienen una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene los aminoácidos contiguos del 10 al 23 de la secuencia de referencia, péptido 1; (b) una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de aminoácidos definida en (a); y (c) una variante de la secuencia de aminoácidos definida en (a), en la que la variante se selecciona del grupo que consiste en una variante de sustitución, una variante de delección, una variante de adición, y combinaciones de las mismas, en donde las secuencias de aminoácidos preferidas comprenden la 23-mer: péptido 2; el 22-mer: el péptido 4; el 21-mer: el péptido 7; el 20-mer: el péptido 11; el 19-mer: el péptido 16; el 18-mer: el péptido 22; el 17-mer: el péptido 29; el 16-mer: el péptido 37; el 15-mer: el péptido 46; el 14-mer: el péptido 56; el 13-mer: el péptido 67; el 12-mer: el péptido 79; el 11-mer: el péptido 92; y el 10-mer: el péptido 106.

45 La secuencia de aminoácidos de un péptido, por ejemplo de un péptido del primer aspecto de la invención, se puede iniciar a partir del aminoácido N-terminal de la secuencia de referencia del péptido 1 e incluye los restos contiguos A, K, G, y E como en el péptido 219 de la secuencia de referencia del péptido de 1, mientras que en otras realizaciones la secuencia de aminoácidos del péptido termina en el aminoácido C-terminal de la secuencia de referencia del péptido 1 e incluye los restos contiguos A, K, G, y E como en el péptido 219 de la secuencia de referencia del péptido 1.

50 Los péptidos descritos en la presente memoria pueden incluir una o más delecciones, sustituciones, y/o adiciones de aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia. Preferiblemente, las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos conservadoras, o las sustituciones pueden ser sustituciones de aminoácidos no conservadoras. En algunas realizaciones, los péptidos, incluyendo los péptidos con secuencias de aminoácidos que son sustancialmente idénticas o variantes de la secuencia de aminoácidos de referencia, no tendrán delecciones o adiciones si se comparan con los correspondientes aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de referencia, pero pueden tener sustituciones conservadoras o no conservadoras. Las sustituciones de aminoácidos que se pueden hacer en la secuencia de aminoácidos de referencia en los péptidos de la invención incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: la alanina (A) puede estar sustituida por lisina (K), valina (V), leucina (L), o isoleucina (I); el ácido glutámico (E) puede estar sustituido por ácido aspártico (D); la glicina (G) puede estar sustituida por prolina (P); la lisina (K) puede estar sustituida por arginina (R), glutamina (Q), o asparagina (N); la fenilalanina (F) puede estar sustituida por leucina (L), valina (V), isoleucina (I), o alanina (A); la prolina (P) puede estar sustituida por glicina (G); la glutamina (Q) puede estar sustituida por ácido glutámico (E) o asparagina (N); la arginina (R) puede estar sustituida por lisina (K), glutamina (Q), o asparagina (N); la serina (S) puede estar sustituida por treonina; la treonina

(T) puede estar sustituida por serina (S); y la valina (V) puede estar sustituida por leucina (L), isoleucina (I), metionina (M), fenilalanina (F), alanina (A), o norleucina (Nle). Por ejemplo, las sustituciones que se podrían hacer en la secuencia de aminoácidos de referencia en los péptidos de la invención incluyen la sustitución de alanina (A) por fenilalanina (F) (por ejemplo, en el aminoácido en posición 4 de la secuencia de aminoácidos de referencia), el ácido glutámico (E) por glutamina (Q) (por ejemplo, en el aminoácido en posición 3 de la secuencia de aminoácidos de referencia), la lisina (K) por alanina (A) (por ejemplo, en los aminoácidos en posición 2 y/o 8 de la secuencia de aminoácidos de referencia), y/o la serina (S) por treonina (T) (por ejemplo, en el aminoácido en posición 7 de la secuencia de aminoácidos de referencia).

Cuando las sustituciones se incluyen en las secuencias de aminoácidos de los péptidos descritos en la presente memoria (en donde los péptidos del primer aspecto de la invención comprenden acetilación del extremo N-terminal y pueden estar químicamente modificados por ejemplo por modificación del extremo C-terminal por la formación de una amida) con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia, hay preferiblemente por lo menos un 80% de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos del péptido y la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos tienen de 5 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de un aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente de 80% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de un aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 90% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de un aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 95% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 16 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 87,5% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de dos aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 90% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 15 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de tres aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de tres aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 85% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la sustitución de cuatro aminoácidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 83% (es decir, ~82,6%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia.

En los péptidos descritos en la presente memoria, con respecto a la secuencia de aminoácidos contiguos del péptido de referencia (que es un 24-mer) la sustitución de un aminoácido en una secuencia de 23 aminoácidos contiguos (un 23-mer) seleccionada de la secuencia de referencia de 24 aminoácidos proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95,65% (o ~96%) de identidad de secuencia con el segmento de aminoácidos del péptido de referencia con el que el 23-mer tiene identidad. Análogamente, la sustitución de dos, tres, cuatro, y cinco aminoácidos en dicho 23-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 91,30% (o ~91%), 86,96% (o ~87%), 82,61% (o ~83%), y 78,27% (o ~78%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro, y cinco aminoácidos en un 22-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95,45% (o ~95%), 90,91% (o ~91%), 86,36% (o ~86%), 81,82% (o ~82%), y 77,27% (o ~77%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro, y cinco aminoácidos en un 21-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95,24% (~95%), 90,48 (~91%), 85,71% (~86%), 80,95 (~81%), y 76,19% (~76%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, cuatro y cinco aminoácidos en un 20-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 95,00% (95%), 90,00% (90%), 85,00% (85 %), 80,00% (80%), y 75,00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, y cuatro aminoácidos en un 19-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94,74% (~95%), 89,47% (~89%), 84,21% (~84%), y 78,95% (~79%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, sustitución de uno, dos, tres, y cuatro aminoácidos en un 18-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94,44% (~94%), 88,89% (~89%), 83,33% (~83%), y 77,78% (~78%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, y cuatro aminoácidos en un 17-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 94,12% (~94%), 88,23% (~88%), 82,35% (~82%), y 76,47% (~76%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, tres, y cuatro aminoácidos en un 16-mer

proporciona un péptido con una secuencia de amino ácido que tiene un 93,75% (~94%), 87,50% (~88%), 81,25% (~81%), y 75,00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, y tres aminoácidos en un 15-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 93,33% (~93%), 86,67% (~87%), y 80,00% (80%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, y tres aminoácidos en un 14-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 92,86% (~93%), 85,71% (~86%), y 78,57% (79%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, y tres aminoácidos en un 13-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 92,31% (~92%), 84,62% (~85%), y 76,92% (~77%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno, dos, y tres aminoácidos en un 12-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 91,67% (~92%), 83,33% (~83%), y 75,00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, sustitución de uno y dos aminoácidos en un 11-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 90,91% (~91%) y 81,82% (~82%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, sustitución de uno y dos aminoácidos en un 10-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 90,00% (90%) y 80,00% (80%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, sustitución de uno y dos aminoácidos en un 9-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 88,89% (~89%) y 77,78% (~78%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de uno y dos aminoácidos en un 8-mero proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 87,50% (~88%) y 75,00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Análogamente, la sustitución de un aminoácido en un 7-mer, 6-mer, 5-mer, y 4-mer proporciona un péptido con una secuencia de aminoácidos que tiene un 85,71% (~86%), 83,33% (~83,3%), 80,00% (80%), y 75,00% (75%) de identidad de secuencia, respectivamente, con la secuencia de aminoácidos del péptido de referencia. Las secuencias de aminoácidos preferidas de esta invención tienen más de un 80% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia, más preferiblemente entre 81% y 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia, y más preferiblemente entre 80% y 96% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de la secuencia de referencia. Una secuencia de aminoácidos puede estar opcionalmente químicamente unida al N-terminal en el grupo amino terminal del péptido a un grupo de restos de ácido carboxílico alifático lineal de C2 a C22, más preferiblemente a un grupo de restos de ácido carboxílico alifático lineal de C2 a C16, más preferiblemente un grupo de restos de ácido carboxílico alifático lineal de C2 a C22, por medio de un enlace amida, y opcionalmente químicamente unida al C-terminal en el grupo carboxílico terminal del péptido a una amina tal como amoníaco o una amina primaria o secundaria como una amina primaria alifática lineal de C1 a C16, por un enlace amida.

Los ejemplos de variantes de sustitución del péptido 79, un 12-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 238, donde Q en la posición 3 del péptido 79 se ha sustituido por E en la secuencia 238; el péptido 233, donde A en la posición 2 del péptido 79 se ha sustituido por K en el péptido 233; el péptido 234, donde A en la posición 8 del péptido 79 se ha sustituido por K en el péptido 234; el péptido 235, donde A en las posiciones 2 y 8 del péptido 79 se han sustituido por K en el péptido 235; el péptido 237, donde F en la posición 4 del péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 237; el péptido 239, donde K en la posición 10 del péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 239; el péptido 240, en donde G en la posición 11 del péptido 79 ha sido sustituido por A en el péptido 240; y el péptido 241, donde E en la posición 12 del péptido 79 se ha sustituido por A en el péptido en 241.

Ejemplos de variantes de sustitución del péptido 106, un 10-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 236, donde F en la posición 4 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 236; el péptido 242, en donde G en la posición 1 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 242; el péptido 243, donde Q en la posición 3 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 243; el péptido 244, donde S en la posición 5 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 244; el péptido 245, donde K en la posición 6 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 245; el péptido 247, donde T en la posición 7 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 247; el péptido 248, donde K en la posición 10 del péptido 106 ha sido sustituido por A en el péptido 248; el péptido 249, donde K en las posiciones 6 y 10 del péptido 106 han sido ambos sustituidos, cada uno por A, en el péptido 249.

Los ejemplos de una variante de sustitución del péptido 137, un 8-mero, incluyen, por ejemplo, el péptido 250, donde F en la posición 4 del péptido 137 ha sido sustituido por A en el péptido 250.

Los ejemplos de una variante de sustitución del péptido 219, un 4-mer, incluyen, por ejemplo, el péptido 251, donde K en la posición 2 del péptido 219 ha sido sustituido por A en el péptido 251.

Una variante de sustitución del péptido tal como se describe en la presente memoria puede estar en forma de un péptido aislado o en forma de un péptido modificado químicamente tal como, por ejemplo, una amida N-terminal, como una amida miristoilada, una amida de acetilo, y similares como se describe en la presente memoria, y como, por ejemplo, una amida C-terminal como una amida formada con amoníaco, y como ambas una amida N-terminal y una amida C-terminal. Los péptidos de la invención comprenden un grupo acetilo N-terminal.

5 Cuando se incluyen deleciones en las secuencias de aminoácidos de los péptidos del primer aspecto de la invención con respecto a la secuencia de aminoácidos de referencia, hay preferiblemente por lo menos 80% de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos del péptido con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 5 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de un aminoácido con respecto al péptido de referencia tendrán entre 80% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de un aminoácido con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 90% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de un aminoácido con respecto al péptido de referencia tendrán entre 95% y aproximadamente 96% (es decir, ~95,7%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 10 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de dos aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 16 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de dos aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 87,5% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de dos aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 90% y aproximadamente 92% (es decir, ~91,3%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 15 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de tres aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de tres aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 85% y aproximadamente 87% de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia. Los péptidos que tienen de 20 a 23 aminoácidos y que incluyen la deleción de cuatro aminoácidos con respecto al péptido de referencia tendrán entre aproximadamente 80% y aproximadamente 83% (es decir, ~82,6%) de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de referencia.

Como se indicó anteriormente, uno o más de los aminoácidos de los péptidos pueden también estar modificados químicamente. Se pueden realizar cualquier modificación de aminoácidos de las conocidas en la técnica en los aminoácidos de los péptidos utilizando cualquier método conocido en la técnica.

30 En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal puede estar modificado. Los péptidos del primer aspecto de la invención están acetilado en el extremo N-terminal. Por ejemplo, el aminoácido C-terminal de los péptidos puede estar amidado o esterificado en el grupo carboxilo (-COOH) C-terminal. El aminoácido C-terminal de los péptidos también puede estar modificado químicamente. Por ejemplo, el grupo carboxilo C-terminal del aminoácido C-terminal puede estar modificado químicamente por conversión a un grupo carboxamida en lugar del grupo carboxilo (es decir, amidado). En algunas realizaciones, el aminoácido C-terminal no está modificado químicamente. En algunas realizaciones, el grupo N-terminal está acetilado y el grupo C-terminal no está modificado. En algunas realizaciones, ambos grupos N-terminal y C-terminal están modificados.

40 En los péptidos del primer aspecto de la invención, el aminoácido N-terminal está modificado en el extremo amino terminal por un grupo acetilo (es decir, -C(O)CH₃, que es el grupo preferido), dicho grupo está unido covalentemente al grupo amino terminal del péptido por medio de un enlace amida.

45 El grupo ácido carboxílico del C-terminal del aminoácido C-terminal de los péptidos descritos en la presente memoria puede también estar modificado químicamente. Por ejemplo, el aminoácido C-terminal puede estar modificado químicamente por reacción del grupo ácido carboxílico del C-terminal del péptido con una amina para formar un grupo amida tal como una amida de amoniaco, que es el grupo preferido; una amida de una alquilamina alifática de C1 a C12, preferiblemente una amina alifática alquímica lineal; una amida de una alquilamina alifática de C2 a C12 sustituida con hidroxilo; una amida de un grupo oxiethylamina lineal (de C1 a C12 alquilo alifático); y una amida de un grupo omega-metoxi-poli(etileno)xi-n-etilamina (también referido como un grupo omega-metoxi-PEG-alfa-amina o un grupo omega-metoxi-(polietilenglicol)amina), donde n es de 0 a 10. El grupo ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster seleccionado del grupo que consiste en un éster de un alcohol alquilo alifático de C1 a C12 y un éster de un grupo 2-(omega-metoxi-poli(etileno)xi)n-etanol (MPEG), donde n es de 0 a 10. En un aspecto de la invención, un componente de polietilenglicol como en un éster de PEG, un éster de MPEG, una amida de PEG, una amida MPEG y similares tiene preferiblemente un peso molecular aproximadamente de 500 a 40.000 Daltons, más preferiblemente de 1.000 a 25.000 Daltons, y más preferiblemente aproximadamente de 1.000 a 10.000 Daltons.

55 El grupo ácido carboxílico de extremo C-terminal del péptido, que puede representarse por la fórmula péptido-C(O)OH, pueden también estar amidado por conversión a una forma activada tal como un haluro de ácido carboxílico, un anhídrido de ácido carboxílico, un éster de N-hidroxi succinimida, un éster de pentafluorofenilo (OPfp), un éster de 3-hidroxi-2,3-dihidroxi-4-oxo-benzo-triazona (ODhbt), y similares para facilitar la reacción con amoniaco o con una amina primaria o secundaria, preferiblemente amoniaco o una amina primaria, y, preferiblemente, mientras que cualesquiera otros grupos reactivos del péptido están protegidos por grupos protectores sintéticos químicamente compatibles bien conocidos en la técnica de síntesis de péptidos, especialmente de síntesis de péptidos en fase sólida, tales como un éster de bencilo, un éster de t-butilo, un éster de

- fenilo, etc. Un péptido amidado resultante puede estar representado por la fórmula péptido-C(O)-NR₃R₄ (estando la amida en el extremo C-terminal del péptido) en donde R₃ y R₄ se seleccionan independientemente del grupo que consiste en de hidrógeno; alquilo de C₁ a C₁₂ tales como metilo, etilo, butilo, isobutilo, ciclopropilmetilo, hexilo, dodecilo y opcionalmente superiores, por ejemplo, de C₁₄ a C₂₄ tales como tetradecilo, y similares como se describió anteriormente.
- 5 El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal también se puede convertir en una amida de una amina alquilo alifática de C₂ a C₁₂ sustituida con un hidroxilo (el grupo hidroxilo está unido a un átomo de carbono en lugar de al átomo de nitrógeno de la amina) tales como 2-hidroxiethylamina, 4-hidroxiethylamina, y 12-hydroxydodecylamine, y similares.
- 10 El ácido carboxílico C-terminal también se puede convertir en una amida de una amina alquilo alifática de C₂ a C₁₂ sustituida con hidroxilo, en donde el grupo hidroxilo puede estar acilado para formar un éster con un ácido carboxílico alifático de C₂ a C₁₂ como se describió anteriormente. Preferiblemente, en el péptido amidado en el extremo C-terminal del péptido representado por la fórmula péptido-C(O)NR₅R₆, R₅ es hidrógeno y R₆ se selecciona del grupo que consiste en hidrógeno, alquilo de C₁ a C₁₂, y alquilo de C₂ a C₁₂ hidroxilo-sustituido.
- 15 El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal se puede convertir en una amida de una oxietilamina 2- (alquilo alifática de C₁ a C₁₂ a) lineal. Esta amida se puede preparar, por ejemplo, por reacción de un alcohol alifático de C₁ a C₁₂ lineal con hidruro de potasio en diglima con 2-cloroetanol para proporcionar un etanol alquilo alifático de C₁ a C₁₂ lineal, que puede convertirse en una amina por oxidación de un aldehído, seguido de una aminación reductora a una amina (por ejemplo utilizando amoniaco), o por conversión en un haluro de alquilo (por ejemplo, usando cloruro de tionilo) seguido de un tratamiento con una amina tal como el amoniaco.
- 20 El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal se puede convertir en una amida de una amina lineal de PEG (por ejemplo, alfa-amina omega de PEG (de C₁ a C₁₂) como alfa-amina omega-metoxi de PEG, es decir, MPEG-amina). En un aspecto de la invención, el componente polietilenglicol o PEG tiene preferiblemente un peso molecular aproximado de 500 a 40.000 Daltons, más preferiblemente de 1.000 a 25.000 Daltons, y más preferiblemente aproximadamente de 1.000 a aproximadamente 10.000 Daltons.
- 25 El ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal también se puede convertir en una amida de una omega-metoxi-poli (etilenoxi) N-etilamina, donde n es de 0 a 10, que se puede preparar a partir la correspondiente omega-metoxi-poli (etilenoxi) n-etanol, por ejemplo, por la conversión del alcohol en una amina como se describe anteriormente.
- 30 En otra realización, el carboxilo C-terminal se puede convertir en una amida representada por la fórmula péptido-C(O)-NR₇R₈, en donde R₇ es hidrógeno y R₈ es un grupo 2-(alquilo alifático de C₁ a C₁₂) oxietilo lineal en el que la parte alquilo alifática de C₁ a C₁₂ es como se describe anteriormente, e incluye grupos tales como metoxietilo (es decir, CH₃O-CH₂CH₂-), 2-dodeciloxietil, y similares: o R₇ es hidrógeno y R₈ es grupo un omega-metoxi-poli (etilenoxi) N-etilo donde el n de la parte (etilenoxi) poli es de 0 a 10, tal como 2-metoxietilo (es decir, CH₃O-CH₂CH₂-), omega-metoxietoxietilo (es decir, CH₃O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-) hasta CH₃O-(CH₂CH₂O)₁₀-CH₂CH₂-.
- 35 El grupo de ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster de un alcohol de alquilo alifático de C₁ a C₁₂, la parte alquilo del alcohol alifático como se describió anteriormente. El grupo de ácido carboxílico C-terminal del aminoácido C-terminal del péptido también puede estar en forma de un éster de un grupo 2-(omega-metoxi-poli (etilenoxi) n)-etanol en donde n es de 0 a 10, que se puede preparar a partir de la reacción de 2-metoxietanol como un 2-metoxi etanolato de sodio con cantidades estequiométricas de óxido de etileno, la cantidad estequiométrica depende del tamaño de n.
- 40 Una cadena lateral de un aminoácido de los péptidos también se puede modificar químicamente. Por ejemplo, un grupo fenilo en una fenilalanina o tirosina puede estar sustituido con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en:
- 45 un grupo alquilo alifático de C₁ a C₂₄ (es decir, lineal o ramificado, y/o saturado o insaturado, y/o que contiene un grupo cíclico), tal como metilo (preferido), etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo, ciclopropilo, 2- metilciclopropilo, ciclohexilo, octilo, decilo, dodecilo, hexadecilo, octadecilo, eicosanilo, docosanilo, tetracosanil, 9-hexadecenoilo, 9-octadecenoilo, 11-octadecenoilo, 9,12-octadecadienoilo, 9,12,15-octadecatrienoilo, 6,9,12-octadecatrienoilo, 9-eicosenoilo, 5,8,11,14-eicosatetraenoilo, 5,8,11,14,17-eicosapentaenoilo, 13-docosenilo, y 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoilo;
- 50 un grupo alquilo alifático de C₁ a C₁₂ sustituido con un grupo hidroxilo alejado por lo menos un átomo de carbono de un sitio de insaturación, ejemplos de los grupo hidroxialquilo incluyen de hidroximetilo, hidroxietilo, hidroxidodecilo, y similares;
- un grupo alquilo de C₁ a C₁₂ sustituido con un grupo hidroxilo que está esterificado con un grupo carboxilo alifático de C₂ a C₂₅ de un ácido tal como el ácido acético, ácido butanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido 9-hexadecenoico, ácido octadecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido 11-octadecenoico, ácido 9,12-octadecadienoico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico, ácido 6,9,12-octadecatrienoico, ácido eicosanoico, ácido 9-eicosenoico, ácido 5,8,11,14-
- 55

eicosatetraenoico, ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, ácido docosanoico, ácido 13-docosenoico, ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, ácido tetracosanoico, y similares, un ácido dicarboxílico tal como ácido succínico, o un hidroxiaácido tal como ácido láctico, en donde el número total de átomos de carbono del sustituyente éster es de entre 3 y 25;

5 halógeno tales como fluoro-, cloro-, bromo-, y yodo-; nitro-;

aminos- tales como NH₂, metilamino, dimetilamino; trifluorometilo-;

carboxilo (-COOH);

10 un alcoxi de C1 a C24 (tal como el que se puede formar por alquilación de tirosina), tal como metoxi, etoxi, propiloxi, isopropiloxi, butiloxi, isobutiloxi, ciclopropiloxi, 2-metoxiciclopropiloxi, ciclohexiloxi, octiloxi, deciloxi, dodeciloxi, hexadeciloxi, octadeciloxi, eicosaniloxi, docosaniloxi, tetracosaniloxi, 9-hexadeceniloxi, 9 - octadeceniloxi, 11-octadeceniloxi, 9,12-octadecadieniloxi, 9,12,15-octadecatrieniloxi, 6,9,12-octadecatrieniloxi, 9-eicoseniloxi, 5,8,11,14-eicosatetraeniloxi, 5,8,11,14,17-eicosapentaeniloxi, 13-docoseniloxi y 4,7,10,13,16,19-docosahexaeniloxi; y

un hidroxialquilo de C2 a C12 tal como 2-hidroxietiloxi y sus ésteres con ácidos carboxílicos tales como se describen anteriormente, o con ácido trifluoroacético.

15 Un grupo hidroxilo de la serina puede estar esterificado con un sustituyente seleccionado del grupo que consiste en:

un grupo ácido carboxílico alifático de C2 a C12 tal como se describe anteriormente;

un grupo de ácido trifluoroacético; y

un grupo de ácido benzoico.

20 El grupo épsilon amino de la lisina puede ser modificado químicamente, por ejemplo, por la formación de una amida con: un grupo ácido carboxílico alifático de C2 a C12 (por ejemplo, por reacción de la amina con una forma activada químicamente de un ácido carboxílico tal como un cloruro de acilo, un anhídrido, un éster de N-hidroxi succinimida, un éster de pentafluorofenilo (OPfp), un 3-hidroxi-2,3-dihidro-éster 4-oxo-benzo-triazona (ODhbt), y similares) tal como se describió anteriormente, o un grupo ácido benzoico, o un grupo aminoacídico. Además, el grupo épsilon amino de la lisina puede estar modificado químicamente por alquilación con uno o dos grupos alquilo alifáticos de C1 a C4.

25 El grupo de ácido carboxílico en ácido glutámico puede estar modificado por la formación de una amida con una amina tal como: amoniaco; un Cl a C 12 alquil amina alifática primaria (la porción alquilo de los cuales es como se describe anteriormente) incluyendo con metilamina; o un grupo amino de un aminoácido.

30 El grupo de ácido carboxílico del ácido glutámico puede estar modificado por la formación de un éster con un grupo hidroxialquilo alifático de C1 a C12 como se describe anteriormente, preferiblemente un éster con un alcohol primario alquilo alifático de C1 a C12 tal como metanol, etanol, propan-1-ol, n-dodecanol, y similares como se describió anteriormente.

35 El método de administración de un péptido como se describe en la presente memoria define la reducción de la liberación de un mediador de la inflamación por bloqueo o inhibición del mecanismo que libera un mediador de la inflamación por la célula inflamatoria del dicho sujeto.

El método de administración tal como se describe en la presente memoria incluye la incorporación o la mezcla de los péptidos descritos con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica. Un péptido para el uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención se puede combinar con un vehículo farmacéuticamente aceptable para formar una composición farmacéutica.

40 El método de administración tal como se describe en la presente memoria incluye la liberación de por lo menos una cantidad de reductor de la liberación del mediador de la inflamación para reducir la liberación de dicho mediador de la inflamación por lo menos por una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador de la inflamación que se produciría por lo menos por una célula inflamatoria del mismo tipo en ausencia de por lo menos un péptido. La célula inflamatoria en dicho sujeto puede ser un leucocito, un granulocito, un basófilo, un eosinófilo, monocito, macrófago o una combinación de los mismos.

45 En la presente memoria, el mediador de la inflamación liberado de por lo menos un gránulo de por lo menos una célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), peroxidasa de eosinófilos (EPO), proteína básica principal [MBP], lisozima, granzima, histamina, proteoglicanos, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito de ácido araquidónico, defensina, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidase, alfa-manosidasa, fosfolipasa A2, condroitina-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, receptor de N-formilmetionil-leucil-fenil alanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b₅₅₈, factor quimiotáctico de monocitos, histaminasa, proteína de unión a la vitamina B12, gelatinasa, activador del

plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, el mediador de la inflamación se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), peroxidasa de eosinófilos (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima y una combinación de las mismas.

5 En la presente memoria, la cantidad de dicho péptido eficaz para reducir la liberación del mediador la inflamación comprende una cantidad de péptido inhibidora de la desgranulación que reduce la cantidad de un mediador de la inflamación liberado por lo menos por una célula inflamatoria aproximadamente de 1% a aproximadamente 99% o preferiblemente aproximadamente de 5-50% a aproximadamente 99%, en comparación con la cantidad liberada por lo menos por una célula inflamatoria en ausencia del péptido.

10 El método tal como se describe en la presente memoria, y los péptidos que se utilizan según la invención, son útiles para el tratamiento de un sujeto afectado o que sufre una enfermedad respiratoria. Esta enfermedad respiratoria puede ser asma, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y fibrosis quística. Los sujetos que pueden ser tratados por la presente invención son preferiblemente mamíferos, tales como humanos, caninos, equinos y felinos.

15 El método de administración de los péptidos para uso según el primer aspecto de la invención es administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal, y administración oral. Más preferiblemente, la administración pulmonar comprende un aerosol, que puede generarse por de un inhalador de polvo seco, un inhalador con dosis medida o un nebulizador. Adicionalmente, la administración al sujeto puede incluir además la administración de una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto anti-inflamatorio, y un inmunomodulador.

20 Esta invención se utiliza para el tratamiento de un sujeto que está afligido o que sufre una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en una enfermedad intestinal, una enfermedad de la piel, una enfermedad autoinmune, un síndrome del dolor, y combinaciones de los mismos. Más específicamente, la enfermedad intestinal se selecciona entre el grupo que consiste en colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome del intestino irritable. Las enfermedades de la piel que también se puede tratar con el presente método incluyen rosácea, eczema, psoriasis y acné severo. Además un sujeto que sufra artritis también se puede tratar con la presente invención.

25 También se describe en la presente memoria el método útil para la reducción de la hipersecreción de moco en un sujeto por medio de la administración de los péptidos descritos en la presente memoria para igualmente reducir la hipersecreción de moco relacionada con MARCKS por lo menos por una célula o tejido secretor de moco en el sujeto, con lo que la hipersecreción de moco en el sujeto se reduce en comparación con la que tendría lugar en ausencia de la administración de dicho péptido.

30 También se describe en la presente memoria un péptido aislado como se describe en los párrafos anteriores y tal y como se describe en la presente memoria y un excipiente. La invención también abarca una composición farmacéutica que comprende un péptido aislado un péptido aislado como se describe en los párrafos anteriores y como se describe en la presente memoria y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede ser además preferiblemente estéril, esterilizable o esterilizada. Estos péptidos pueden estar contenidos en un kit con reactivos útiles para la administración.

Breve Descripción de los Dibujos

35 Figs. 1A-1B ilustran que la fosforilación dependiente de PKC libera MARCKS desde la membrana plasmática al citoplasma.

FIG. 2A-2C muestran que PKG induce la desfosforilación de MARCKS activando PP2A.

FIG. 3 muestra gráficos de barras que demuestran que PP2A es un componente esencial de la ruta secretora de mucina.

FIG. 4 es un gel que ilustra que MARCKS se asocia con la actina y la miosina en el citoplasma.

45 FIG. 5 ilustra un mecanismo de señalización de control de la secreción de MPO en neutrófilos.

FIG. 6 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de mieloperoxidase de neutrófilos caninos aislados.

FIG. 7 es un gráfico de barras que representa la capacidad del péptido MANS para bloquear la secreción de mieloperoxidase de neutrófilos humanos aislados.

50 FIG. 8 es un gráfico de barras que muestra que PMA estimula un pequeño aumento en la secreción de MPO de neutrófilos humanos estimulados por LPS que incrementa dependiendo de la concentración por co-estimulación con 8-Br-GMPc.

FIG. 9 es un gráfico de barras que muestra que la estimulación con 8-Br-GMPc tiene poco efecto sobre la secreción de MPO de neutrófilos humanos estimulados con LPS hasta que se produce una co-estimulación con PMA de una manera dependiente de la concentración.

5 FIG. 10 es un gráfico de barras que muestra que PMA estimula un pequeño aumento en la secreción de MPO de neutrófilos caninos estimulados por LPS que es mayor en una manera dependiente de la concentración por la co-estimulación con 8-Br-GMPc.

FIG. 11 es un gráfico de barras que muestra que la simulación con 8-Br-GMPc tiene poco efecto sobre la secreción de MPO de neutrófilos caninos estimulados por LPS hasta que se produce una co-estimulación con PMA de una manera dependiente de la concentración.

10 FIG. 12 es un gráfico de barras que muestra se requiere la co-estimulación con PMA+8-Br-GMPc para la máxima secreción de MPO por neutrófilos caninos estimulados con LPS.

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se describirá en lo sucesivo más completamente con referencia a las figuras adjuntas, en las que se ilustran las realizaciones preferidas de la invención. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención. El uso de las palabras "uno" o "una" en este documento para describir cualquier aspecto de la presente invención debe ser interpretado como una indicación de uno o más.

20 En la presente memoria se describe un método de inhibición de la liberación por exocitosis de por lo menos un mediador de la inflamación por lo menos por una célula inflamatoria que comprende poner en contacto la al menos una célula inflamatoria, célula que comprende por lo menos un mediador de la inflamación contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, con por lo menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad eficaz para reducir la liberación del mediador de la inflamación por la célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador de la inflamación que se produciría por el mismo tipo de células inflamatorias en ausencia de el al menos un péptido.

25 También se describe en la presente memoria un método para inhibir la liberación de por lo menos un mediador de la inflamación por lo menos por una célula inflamatoria en un tejido o fluido de un sujeto que comprende la administración al tejido y/o fluido del sujeto, que comprende por lo menos una célula inflamatoria que comprende por lo menos un mediador de la inflamación contenido dentro de una vesícula dentro de la célula, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición farmacéutica que comprende por lo menos un péptido seleccionado del grupo que consiste en un péptido MANS y un fragmento activo del mismo en una cantidad terapéuticamente eficaz para reducir la liberación del mediador de la inflamación por lo menos por una célula inflamatoria en comparación con la liberación del mediador de la inflamación que se produciría con por lo menos un mismo tipo de células inflamatorias en ausencia de el al menos un péptido. Más específicamente, la reducción de la liberación de un mediador de la inflamación comprende bloquear o inhibir el mecanismo que libera un mediador de la inflamación a partir de la célula inflamatoria.

30 También se describe en la presente memoria y a lo largo de toda la descripción el contacto y/o la administración del péptido descrito anteriormente con cualquier célula inflamatoria conocida que pueda estar contenida en el tejido o fluido de un sujeto que contiene por lo menos un mediador de la inflamación contenido dentro de una vesícula dentro de la célula. La célula inflamatoria es preferiblemente un leucocito, más preferiblemente un granulocito, que puede clasificarse adicionalmente como un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo o una combinación de los mismos. Las células inflamatorias que se contactan con el presente procedimiento también pueden ser un monocito/macrófago.

35 También se describe en la presente memoria la reducción de la liberación de mediadores de la inflamación contenidos en las vesículas por las células inflamatorias y estos mediadores de la inflamación se seleccionan del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), peroxidasa de eosinófilos (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito del ácido araquidónico, defensina, la proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A₂, condroitin-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor de complemento, receptor de N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b₅₅₈, factor quimiotáctico de monocitos, histaminasa, proteína de unión a la vitamina B12, gelatinasa, activador del plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos. Preferiblemente, estos mediadores de la inflamación se seleccionan del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), peroxidasa de eosinófilos (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima y una combinación de los mismos.

55 En un primer aspecto, las presentes invenciones proporcionan un péptido para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes, o un síndrome del dolor, en el que dicho péptido se selecciona entre el grupo que consiste en:

5 acetil-GAQFSKTAAK (SEC ID NO: 106), acetil-AQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAERPGE (SEC ID NO: 11), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEC ID NO: 37), acetil-AKGEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 45), acetil-GAQFSKTAAKGE (SEC ID NO: 79), acetil-AAAERPGEAAVA (SEC ID N°: 91), acetil-GAQFSKTA (SEC ID NO: 121), acetil-TAAKGEAA (SEC ID NO: 143), acetil-RPGEAAVA (SEC ID N°: 153), acetil-AKGE (SEC ID NO: 219), acetil-GAQFSKTAAGE (SEC ID NO: 239), acetil-GAQFSKTA (SEC ID N°: 248), acetil-GAQFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 79), acetil-AQFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 93), acetil-QFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 108), acetil-FSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 124), acetil-SKTAAKGE-NH₂ (SEC ID N°: 141), y acetil-AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 219).

10 En uso, la presente invención pone en contacto una cantidad eficaz del péptido del primer aspecto de la invención con una célula inflamatoria, donde la cantidad eficaz puede ser definida como una cantidad de péptido inhibidor de la desgranulación que reduce la cantidad de un mediador inflamatorio liberado por lo menos por una célula inflamatoria aproximadamente de 1% a aproximadamente 99% en comparación con la cantidad liberada por lo menos por una célula inflamatoria en ausencia del péptido. Esta cantidad es también conocida como la cantidad que reduce la liberación del mediador de la inflamación. Más preferiblemente, esta cantidad eficaz del péptido en contacto
15 comprende una cantidad de péptido la inflamación inhibidor de la desgranulación que reduce la cantidad del mediador de la inflamación liberado por lo menos por una célula inflamatoria aproximadamente de 5-50% a aproximadamente 99% en comparación con la cantidad liberada por lo menos por una célula inflamatoria en ausencia del péptido.

20 El sujeto puede estar afectado por una enfermedad intestinal, una enfermedad de la piel, una enfermedad autoinmune, un síndrome del dolor, y combinaciones de los mismos. La enfermedad intestinal puede ser colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn o síndrome del intestino irritable. El sujeto puede estar afectado por una enfermedad de la piel, tal como rosácea, eczema, psoriasis o acné severo. El sujeto puede también estar afectado por la artritis, tal como artritis reumatoide, artritis psoriásica, lupus eritematoso sistémico. Los sujetos afectados por la fibrosis quística también se puede tratar con el presente método y péptidos. El presente método es preferiblemente útil para
25 el tratamiento de sujetos, tales como mamíferos, y preferiblemente seres humanos, caninos, equinos y felinos.

La administración de uno o más péptidos descritos en la presente memoria incluyen la administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal, o administración oral. Más específicamente, la administración pulmonar se selecciona del grupo que consiste en aerosol, inhalador de polvo seco, inhalador de dosis medida, y nebulizador. Además, la administración puede incluir una segunda
30 molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto antiparasitario, un compuesto anti-inflamatorio, y un inmunomodulador.

Una composición farmacéutica puede comprender una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto conocido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una cantidad "terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria es una cantidad de un compuesto que es suficiente para mejorar los síntomas exhibidos por un sujeto. La
35 cantidad terapéuticamente eficaz variará con la edad y la condición física del paciente, la severidad del estado del paciente a tratar, la duración del tratamiento, la naturaleza de cualquier tratamiento concurrente, el vehículo farmacéuticamente aceptable utilizado y factores similares al alcance del conocimiento y la experiencia de los expertos en la técnica. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son preferiblemente de formas dosificación sólida tales como comprimidos o cápsulas. También se pueden usar preparaciones líquidas para administración oral y se pueden preparar en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo, soluciones que contienen un ingrediente activo, azúcar, y una mezcla de etanol, agua, glicerol, y propilenglicol. Si se desea, tales preparaciones líquidas pueden incluir uno o más de los siguientes: agentes colorantes, agentes aromatizantes, y sacarina. Además, se pueden utilizar también agentes espesantes tales como la carboximetilcelulosa, así como otros vehículos
40 aceptables, la selección de los cuales es conocida en el estado de la técnica.

45 Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se refiere a péptidos del primer aspecto de la invención para uso en la regulación de los procesos secretores celulares, especialmente aquellos que liberan de mediadores de la inflamación por las células inflamatorias. Como se usa en la presente memoria, el término "regulación" significa bloquear, inhibir, disminuir, reducir, aumentar, mejorar o estimular. Varios procesos de secreción celular implican la liberación de los contenidos de las vesículas o gránulos unidos a la membrana dentro de las células. Una vesícula o gránulo unido a la membrana se define como una partícula intracelular, que es principalmente vesicular (o una vesícula dentro de una célula) y que contiene el material almacenado que puede ser secretado. Algunos de los contenidos de estas vesículas, tales como los contenidos en las células inflamatorias, han resultado responsables de una variedad de patologías en numerosos tejidos de mamíferos. Algunos de los efectos de estas secreciones parecen incluir el daño del tejido previamente sano durante la inflamación. Esta invención proporciona un medio de
50 bloqueo de la secreción de cualquier vesícula unida a membrana, incluyendo las que se encuentran en células inflamatorias, seleccionando como diana una molécula específica importante en la ruta secretora intracelular por medio de un péptido sintético. Este enfoque puede ser de importancia terapéutica para el tratamiento de una amplia variedad de afecciones hipersecretoras e inflamatorias en humanos y animales.

60 Más específicamente, la presente invención se dirige a células inflamatorias que contienen los mediadores de la inflamación en uno o más gránulos o vesículas dentro del citoplasma de las células. Las células se ponen en contacto con uno o más péptidos que se seleccionan a partir del péptido MANS o un de un fragmento activo del

mismo, todos los cuales se describen en detalle en la presente memoria. Preferiblemente, el contacto del péptido con la célula inflamatoria se realiza a través de la administración a un sujeto afectado o que sufre una enfermedad en la que estas células inflamatorias están presentes al tejido o fluido específico dentro del tejido. Después de la administración o contacto del péptido con la célula, el péptido compite de manera competitiva e inhibe competitivamente la unión de la proteína MARCKS nativa a la membrana de los gránulos o vesículas intracelulares que contienen los mediadores de la inflamación. Como resultado del bloqueo la unión de la proteína MARCKS a las vesículas de las células inflamatorias, las vesículas de estas células no se desplazan a la membrana plasmática de las células como lo harían normalmente cuando son estimuladas para liberar el contenido de mediadores de la inflamación al exterior de la célula de. Por lo tanto, los péptidos que se utilizan en la presente invención inhiben el movimiento de las vesículas a la membrana plasmática de las células, que a su vez, reducen la liberación de los mediadores de la inflamación por las células inflamatorias. La cantidad de mediadores de la inflamación liberados por las células en el tiempo se reduce debido a que tanto la tasa de liberación como la cantidad de mediadores liberados por las células inflamatorias es dependiente de la concentración del péptido administrado y en contacto con las células inflamatorias.

Una ventaja de la presente invención es que puede combinar una terapia que incluye el bloqueo directo de la secreción de moco con una terapia anti-inflamatoria única. Una ventaja de la presente invención sobre las terapias anti-inflamación actuales que afectan a una supresión general del sistema inmune es que se cree que el péptido bloquea la secreción solamente de los componentes intracelulares secretados por las células inflamatorias. Por lo tanto, muchos aspectos del sistema inmune deberían funcionar todavía incluso con la inhibición de los mediadores de la inflamación.

Los compuestos tal y como se describen en la presente memoria se pueden regular, es decir, bloquear, la liberación de mediadores de la inflamación por las células. Esta inhibición de la liberación de mediadores de la inflamación es un medio atractivo de prevenir y tratar una variedad de trastornos, por ejemplo, enfermedades y afecciones patológicas que implican inflamación. Por lo tanto, los compuestos tal y como se describen en la presente memoria pueden ser útiles para el tratamiento de estas afecciones. Estas abarcan enfermedades de las vías respiratorias y enfermedades inflamatorias crónicas, incluyendo, pero no limitándose a, osteoartritis, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barre, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, psoriasis, enfermedad de injerto contra huésped y lupus eritematoso sistémico. Los compuestos tal y como se describen en la presente memoria se pueden usar también para tratar otros trastornos asociados con la actividad de niveles elevados de mediadores y enzimas proinflamatorias tales como las respuestas a varios agentes infecciosos y un número de enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide, síndrome de shock tóxico, la diabetes y enfermedades inflamatorias intestinales.

Usos del péptido según el primer aspecto de la invención incluyen terapias para combatir la inflamación junto con las terapias que combinan la actividad anti-inflamatoria del péptido con su capacidad para bloquear la secreción de moco. Las enfermedades que pueden ser tratadas por la capacidad del péptido para bloquear la inflamación y la secreción de moco incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias intestinales, trastornos digestivos (es decir, inflamación de la vejiga biliar, enfermedad de Menetier).

Otros mediadores proinflamatorios se han correlacionado con una variedad de estados de enfermedad que se correlacionan con la afluencia de neutrófilos a los sitios de inflamación o lesión. Los anticuerpos bloqueantes han demostrado como terapias útiles contra la lesión de los tejidos asociada a neutrófilos en la inflamación aguda (Harada et al., 1996, *Molecular Medicine Today* 2, 482). Las células distintas de los neutrófilos que pueden liberar mediadores de la inflamación incluyen otros leucocitos, tales como basófilos, eosinófilos, monocitos y linfocitos, y terapias que pueden estar dirigidas contra la secreción de estas células. Los neutrófilos, eosinófilos y basófilos son cada uno un tipo de granulocitos, es decir, un leucocito que tiene gránulos en su citoplasma. Los leucocitos sintetizan una serie de mediadores de la inflamación que están empaquetados y almacenados en gránulos citoplasmáticos. Entre estos mediadores están, por ejemplo, la mieloperoxidasa [MPO] en los neutrófilos (Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89:3503-3521), peroxidasa de eosinófilos [EPO] y la proteína básica principal [MBP] en los eosinófilos (Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105:651-663), lisozima en monocitos/macrófagos (Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. *J Leukoc Biol* 1992; 52:173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. *J Immunol* 2003; 170:5276-5280) y la granzima en las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos citotóxicos (Bochan MR, Goebel WS, Brahmi Z. Stably transfected antisense granzyme B and perforin constructs inhibit human granule-mediated lytic ability. *Cell Immunol* 1995; 164:234-239; Gong J H., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8:652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10:369-383; and Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104:183-190-10). Estos mediadores se pueden liberar en sitios de lesión y pueden contribuir a la inflamación y reparación, en el pulmón y en otros lugares, como resultado de la infiltración de estas células en el sitio del tejido de la lesión o enfermedad. Los leucocitos liberan estos gránulos a través de un mecanismo de exocitosis (Burgoyne RD, Morgan A. Secretory granule exocytosis. *Physiol Rev* 2003; 83:581-632; Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932).

- Los mastocitos, que normalmente no circulan por el torrente sanguíneo, y los basófilos contienen gránulos citoplásmicos secretores que almacenan y pueden liberar, tras la activación celular, mediadores de la inflamación preformados (anafilácticos), como la histamina; proteoglicano, tales como la heparina y el sulfato de condroitina; proteasas como triptasa, quimasa, carboxipeptidasa, y proteasa del tipo catepsina-G; factores quimiotácticos, citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico que actúan sobre el sistema vascular, músculo liso, tejido conectivo, glándulas mucosas y células inflamatorias.
- Los neutrófilos, también conocidos como leucocitos polimorfonucleares (PMN), comprenden 50 a 60% del total de los leucocitos circulantes. Los neutrófilos actúan contra los agentes infecciosos, tales como bacterias, hongos, protozoos, virus, células infectadas por virus, así como células tumorales, que penetran las barreras físicas del cuerpo en los sitios de infección o lesión. Los neutrófilos maduros a través de seis fases morfológicas: mieloblasto, promieloblasto, mielocito, metamielocito, neutrófilos no segmentado (banda) y neutrófilos segmentados (funcionalmente activo).
- En los neutrófilos, mediadores de la inflamación se almacenan en gránulos primarios (azurófilos), secundarios (específicos) y terciarios (gelatinasa), así como en las vesículas secretoras. Entre los numerosos mediadores de la inflamación, los gránulos primarios (azurófilos) contienen mieloperoxidasa (MPO), lisozima, defensinas, proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A2, condroitin-4-sulfato, y proteinasa 3 (véase, por ejemplo, Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A. MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 1992; 356:618-622); los gránulos secundarios (específicos) contienen lisozima, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, fosfolipasa A₂, receptores del complemento, por ejemplo, CR3, CR4, receptores de N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptores de laminina, citocromo b₅₅₈, factor quimiotáctico de los monocitos, histaminasa, y proteína de unión a la vitamina B 12; y los gránulos de almacenamiento pequeños contienen gelatinasa, activador del plasminógeno, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, y citocromo b₅₅₈.
- Los gránulos de los neutrófilos contienen sustancias antimicrobianas o citotóxicas, proteinasas neutras, hidrolasas ácidas y un grupo de receptores de la membrana citoplásmica. Entre los constituyentes de los gránulos azurófilos la mieloperoxidasa (MPO) es una enzima crítica en la conversión de peróxido de hidrógeno a ácido hipocloroso. Junto con peróxido de hidrógeno y un cofactor haluro forma un microbicida eficaz y un mecanismo citotóxico de los leucocitos - el sistema de mieloperoxidasa.
- Las defensinas, que constituyen del 30 a 50% de la proteína de los gránulos azurófilos, son péptidos pequeños (peso molecular <4000) antimicrobianos potentes que son citotóxicos para una amplia gama de bacterias, hongos y algunos virus. Su toxicidad puede ser debido a la permeabilización de la membrana de la célula diana que es similar a otras proteínas que forman canales (perforinas).
- La proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI) es un miembro de las perforinas. Es altamente tóxica para las bacterias Gram-negativas, pero no para las bacterias Gram-positivas o los hongos y también puede neutralizar a la endotoxina, el componente lipopolisacárido tóxico de envoltura celular bacteriana gram-negativa.
- La lactoferrina secuestra el hierro libre, evitando de ese modo el crecimiento de microorganismos ingeridos que sobreviven al proceso de mortalidad y aumentando la permeabilidad bacteriana a la lisozima.
- Las serinproteasas tales como la elastasa y la catepsina G hidrolizan las proteínas de las envueltas de células bacterianas. Los sustratos de elastasa de granulocitos incluyen colágeno reticulado y proteoglicanos, así como componentes de elastina de los vasos sanguíneos, ligamentos y el cartílago. La catepsina D escinde los proteoglicanos del cartílago, mientras que las colagenasas de granulocitos son activas en la escisión de tipo I y, en menor grado, en la de tipo III del colágeno de hueso, cartílago, y tendón. Los productos de degradación de colágeno tienen actividad quimiotáctica para neutrófilos, monocitos y fibroblastos.
- La regulación del potencial de destrucción de tejido de las proteasas lisosomales está mediada por inhibidores de la proteasa tales como alfa2-macroglobulina y alfa 1-antiproteasa. Estas antiproteasas están presentes en el suero y fluidos sinoviales. Pueden funcionar por medio de la unión y recubrimiento de los sitios activos de las proteasas. El desequilibrio proteasa-antiproteasa puede ser importante en la patogénesis del enfisema.
- Los gránulos azurófilos funcionan predominantemente en el medio intracelular (en la vacuola fagolisosomal), en el que están involucrados en la eliminación y degradación de los microorganismos. Los gránulos específicos de los neutrófilos son susceptibles de liberar su contenido extracelularmente y tienen un papel importante en la iniciación de la inflamación. Los gránulos específicos representan un depósito intracelular de diversos componentes de la membrana plasmática incluyendo el citocromo b (componente de la NADPH oxidasa, una enzima responsable de la producción de superóxido), los receptores del fragmento del complemento iC3b (CR3, CR4), la laminina, y quimioatrayentes-del formilmetionil péptido. Además de otros, la histaminasa es relevante para la degradación de la histamina, la proteína de unión a la vitamina, y el activador del plasminógeno que es responsable de la formación de plasmina y la escisión de C5a a partir de C5.

La importancia de los gránulos de los neutrófilos en la inflamación se deduce a partir de los estudios de varios pacientes con anomalías congénitas en los gránulos. Los pacientes con síndrome de Chediak-Higashi tienen una anomalía profunda en la tasa de establecimiento de una respuesta inflamatoria y tienen gránulos lisosomales anormalmente grandes. El síndrome congénito de deficiencia de gránulos específicos es un trastorno extremadamente raro caracterizado por la disminución de las respuestas inflamatorias e infecciones bacterianas graves de la piel y de los tejidos profundos.

Aunque los mecanismos que regulan la secreción de exocitosis de estos gránulos sólo se entienden parcialmente, han sido identificadas diversas moléculas clave en el proceso, incluyendo el Ca^{2+} transitorio intracelular (Richter et al. Proc Natl Acad Sci EE.UU. 1990; 87:9472-9476; Blackwood et otros, Biochem J 1990; 266: 195-200), las proteínas G, tirosina y proteínas quinasas (PK, especialmente PKC) (Smolen et al., Biochim Biophys Acta 1990; 1052: 133-142; Niessen et al., Biochim. Biophys Acta 1994; 1223:267-273; Nacler et al., Pettersen et al., Chest 2002; 121; 142-150), Rac2 (Abdel-Latif et al., Blood 2004; 104:832-839; Lacy et al., J Immunol 2003; 170:2670-2679) y varias proteínas SNARE, SNAP y VAMP (Sollner et al., Nature 1993; 362: 318-324; Lacy, Pharmacol Ther 2005; 107:358-376).

Las proteínas SNARE (receptor de la proteína de unión de N-etilmaleimida soluble) son una familia de proteínas asociadas a la membrana que se caracterizan por un dominio de espiral de la hélice alfa llamado el motivo SNARE (Li et al., Cell. Mol. Life Sci. 60: 942-960 (2003)). Estas proteínas se clasifican como v-SNARE y t-SNARE en función de su localización en la vesícula o en la membrana diana; otro esquema de clasificación define R-SNARE y Q-SNARE, en función del resto arginina o glutamina conservado en el centro de motivo SNARE. Las SNARE se localizan en diferentes compartimentos de la membrana de las rutas de tráfico endocítico y de secreción, y contribuyen a la especificidad de los procesos de fusión de las membranas intracelulares. El dominio t-SNARE consiste en un haz de 4 hélices con un giro en espiral de la hélice. El motivo SNARE contribuye a la fusión de las dos membranas. Los motivos SNARE se dividen en cuatro clases: homólogos de sintaxina 1a (t-SNARE), VAMP-2 (v-SNARE), y los motivos SNARE N-y C-terminal de la SNAP-25. Uno de los miembros de cada clase puede interactuar para formar un complejo SNARE. El motivo SNARE se encuentra en los dominios N-terminales de ciertos miembros de la familia de la sintaxina como sintaxina 1a, que es necesaria para la liberación de neurotransmisores (Lerman et al., Biochemistry 39: 8470 a 8479 (2000)), y sintaxina 6, que se encuentra en vesículas de transporte endosomal (Misura et al., Proc Natl Acad Sci EE.UU. 99: 9.184 a 9.189 (2002)).

Las proteínas SNAP-25 (proteína de 25 kDa asociada a sinaptosomas), son componentes de los complejos SNARE, lo que puede explicar la especificidad de la fusión de las membranas y ejecutar directamente la fusión por medio de la formación de un complejo compacto (SNARE o complejo central) que junta las vesículas sinápticas y las membranas plasmáticas. Las SNARE constituyen una gran familia de proteínas que se caracterizan por secuencias de 60 restos conocidas como los motivos SNARE, que tienen una alta propensión a formar hélices enrolladas y, a menudo preceden regiones carboxilo-terminales de transmembrana. El complejo del núcleo sináptico está formado por cuatro motivos SNARE (dos de SNAP-25 y uno de sinaptobrevina y de sintaxina 1) que están estructurados de manera aislada, pero que forman un conjunto o haz de cuatro hélices paralelas. La estructura cristalina del complejo central ha puesto de manifiesto que el haz de hélices está altamente enrollado y contiene varios puentes salinos en la superficie, así como capas de restos hidrófobos interiores. Tres glutaminas (dos de SNAP-25 y uno de sintaxina 1) y una arginina (de sinaptobrevina) forman una capa polar en el centro del complejo (Rizo et al., Nat. Rev. Neurosci 3: 641-653 (2002)). Los miembros de la familia SNAP-25 contienen un grupo de restos de cisteína que se pueden palmitoilar para unirse a la membrana (Risinger et al., J. Biol. Chem. 268: 24408-24414 (1993)).

La principal función de los neutrófilos es fagocitar y destruir los agentes infecciosos. También limitan el crecimiento de algunos microorganismos, antes del inicio de las respuestas inmunológicas adaptadas (específicas). Aunque los neutrófilos son esenciales para la defensa del huésped, también han estado implicados en la patología de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y en el daño por isquemia-reperfusión. Las enzimas hidrolíticas de origen neutrófilo y los inhibidores de la proteasa oxidativamente inactivada se pueden detectar en el fluido aislado de los sitios inflamatorios. En condiciones normales, los neutrófilos pueden migrar a sitios de infección sin dañar los tejidos del huésped. Sin embargo, a veces se puede producir un daño no deseado a un tejido del huésped. Este daño puede ocurrir a través de varios mecanismos independientes. Estos incluyen la activación prematura durante la migración, la liberación extracelular de productos tóxicos al matar algunos microbios, la eliminación de las células huésped infectadas o dañadas y deshechos como un primer paso para la remodelación de tejidos, o que no se hayan concluido las respuestas inflamatorias agudas. El daño por isquemia-reperfusión se asocia con una afluencia de neutrófilos al tejido afectado y la activación subsiguiente. Esto puede ser provocado por las sustancias liberadas por las células huésped dañadas o como consecuencia de la generación de superóxido a través de la xantina oxidasa.

En condiciones normales, la sangre puede contener una mezcla neutrófilos lo normales, preactivados, activados y gastados. En un lugar de la inflamación, están presentes principalmente los neutrófilos activados y gastados. Los neutrófilos activados han mejorado la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI). Se ha detectado una subpoblación de neutrófilos con el estallido respiratorio mejorado en la sangre de las personas con una infección bacteriana aguda y en pacientes con el síndrome de dificultad respiratoria del adulto (ARDS). Este es un ejemplo de una paradoja de los neutrófilos. Los neutrófilos se han implicado en la patología de esta enfermedad debido a la gran afluencia de estas células al pulmón y el daño tisular asociado causado por las enzimas hidrolíticas y oxidantes

liberadas por los neutrófilos activados. El deterioro de la actividad microbicida de los neutrófilos que se produce con el empeoramiento del ARDS puede ser una respuesta protectora por parte del huésped, que se induce localmente por los productos inflamatorios.

5 La fase aguda de la lesión térmica también se asocia con la activación de los neutrófilos, y esto va seguido por un deterioro general de diversas funciones de los neutrófilos. La activación de los neutrófilos por complejos inmunes en el líquido sinovial contribuye a la patología de la artritis reumatoide. La activación crónica de los neutrófilos también puede iniciar el desarrollo del tumor, ya que algunos ROI generados por los neutrófilos dañan el ADN y las proteasas promueven la migración de las células tumorales. En los pacientes que sufren quemaduras graves, se ha establecido una correlación entre el inicio de la infección bacteriana y la reducción en la proporción y el número absoluto de los neutrófilos positivos para anticuerpo y receptores del complemento. Se ha observado que los oxidantes de origen neutrófilo también oxidan las lipoproteínas de baja densidad (LDL), que se unen entonces más eficazmente a la membrana plasmática de los macrófagos a través de los receptores scavenger específicos. La captación de estos LDL oxidados por los macrófagos puede iniciar la aterosclerosis. Además, se han encontrado neutrófilos preactivados en personas con hipertensión esencial, enfermedad de Hodgkin, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, sarcoidosis, y septicemia, donde la preactivación está correlacionada con altas concentraciones circulantes de TNF-alfa (caquectina).

20 El daño hidrolítico a los tejidos huéspedes y por tanto los procesos inflamatorios crónicos se pueden producir cuando las pantallas de antioxidantes y antiproteasa están desbordadas. Se cree que la deficiencia de antiproteasa es responsable de la patología del enfisema. Muchas antiproteasas son miembros de la familia de los inhibidores de la serinproteasa (serpina). Aunque la circulación es rica en antiproteasas, estas proteínas grandes pueden ser excluidas selectivamente de los sitios de inflamación porque los neutrófilos se adhieren a sus dianas. El estrés oxidativo puede iniciar el daño tisular por medio de la reducción de la concentración de antiproteasas extracelulares por debajo del nivel requerido para inhibir proteasas liberadas. Los oxidantes clorados y el peróxido de hidrógeno pueden inactivar a antiproteasas tales como el inhibidor de alfa1- proteasa y la alfa2-macroglobulina, que son inhibidores endógenos de la elastasa, pero al mismo tiempo activar metaloproteasas latentes tales como colagenasas y la gelatinasa, que contribuyen a una mayor inactivación de antiproteasas.

30 Los constituyentes citoplásmicos de los neutrófilos también pueden ser una causa de la formación de anticuerpos anti-citoplasma específicos de neutrófilos (ANCA), que están estrechamente relacionados con el desarrollo de vasculitis sistémica y glomerulonefritis. Los ANCA son anticuerpos dirigidos contra enzimas que se encuentran principalmente dentro de los gránulos azurófilos o primarios de los neutrófilos. Hay tres tipos de ANCA que se pueden distinguir por los patrones que producen por medio de inmunofluorescencia indirecta en los neutrófilos normales fijados con etanol. Normalmente se encuentra fluorescencia granular citoplásmica difusa fina (cANCA) en la granulomatosis de Wegener, en algunos casos de poliarteritis microscópica y síndrome de Churg Strauss, y en algunos casos de glomerulonefritis crescéntica y necrosante segmentaria. El antígeno diana es por lo general la proteinasa 3. Se encuentra fluorescencia perinuclear (pANCA) en muchos casos de poliarteritis microscópica y glomerulonefritis. Estos anticuerpos se dirigen a menudo contra la mieloperoxidasa pero otras dianas incluyen la elastasa, cathepsina G, lactoferrina, lisozima y beta-D-glucuronidasa. El tercer grupo designado ANCA "atípico" incluye fluorescencia nuclear de neutrófilos y algunos patrones citoplásmicos inusuales y mientras algunos de los antígenos diana son compartidos con pANCA, los otros no han sido aún identificados. La pANCA también se encuentra en un tercio de los pacientes con enfermedad de Crohn. La incidencia de ANCA citada en la artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico varía considerablemente, pero los patrones predominantes son pANCA y ANCA atípico.

45 La eosinofilia es una diferenciación terminal de leucocitos en fase final que se encuentra predominantemente en el tejido de la submucosa y se seleccionan para sitios de reacciones inmunes específicas, incluidas las enfermedades alérgicas. El citoplasma eosinófilo contiene grandes gránulos elipsoidales con un núcleo cristalino denso en electrones y una matriz parcialmente permeable. Además de estos gránulos cristaloides grandes primarios, hay otro tipo de gránulo que es más pequeño (gránulo pequeño) y carece de núcleo cristalino. Los grandes gránulos específicos de los eosinófilos contienen por lo menos cuatro proteínas catiónicas distintas, que ejercen una variedad de efectos biológicos en las células huésped y en las dianas microbianas: proteína básica principal (MBP), proteína catiónica de eosinófilos (ECP), neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), y peroxidasa de eosinófilos (EPO). Los basófilos contienen aproximadamente una cuarta parte más de proteína básica principal que de eosinófilos junto con cantidades detectables de EDN, ECP y EPO. También se encuentran pequeñas cantidades de EDN y ECP en los neutrófilos (Gleich G J. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. J Allergy Clin Immunol 2000; 105:651-663). La MBP parece carecer de actividad enzimática, pero es un polipéptido altamente catiónico que pueden ejercer sus actividades tóxicas por medio de interacciones con las membranas lipídicas lo que conduce a su alteración. Tanto MBP y EPO pueden actuar como inhibidores alostéricos selectivos de agonistas uniéndose a receptores los muscarínicos M2. Estas proteínas pueden contribuir a la disfunción del receptor M2 y mejorar la broncoconstricción producida por estimulación vagal en el asma. La EDN puede dañar específicamente la capa de mielina de las neuronas. La histaminasa y una variedad de enzimas lisosomales hidrolíticas también están presentes en los grandes gránulos específicos de los eosinófilos. Entre las enzimas en pequeños gránulos de eosinófilos están la sulfatasa de arilo, la fosfatasa ácida, y una metaloproteínasa de 92 kDa, una gelatinasa. Los eosinófilos pueden elaborar citoquinas que incluyen aquellos con actividades potenciales de factor de crecimiento autocrino para eosinófilos y aquellos con posibles funciones en las respuestas inflamatorias agudas y crónicas. Tres citoquinas

tienen actividades de factor de crecimiento para eosinófilos: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-3 e IL-5. Otras citocinas producidas por los eosinófilos humanos que pueden tener actividades en las respuestas inflamatorias agudas y crónicas incluyen IL-1-alfa, IL-6, IL-8, TNF-alfa y los factores de crecimiento transformantes, TGF-alfa y TGF-beta.

- 5 Los eosinófilos contienen gránulos cristaloides que contengan MBP, proteína catiónica de eosinófilos, EPO, y neurotoxina derivada de eosinófilos (Gleich, J Allergy Clin Immunol 2000; 105:651-663). La línea celular promielocítica humana HL-60 clon 15 se puede utilizar para examinar la secreción de EPO. Esta línea celular se estableció a partir de un clon de HL-60 que había sido cultivada a un pH elevado durante dos meses (Fischkoff, Leuk Res 1988; 12:679-686) y luego se trató con ácido butírico para permitir que las células se diferencien a fin para exhibir muchas de las características de los eosinófilos de sangre periférica, incluyendo la expresión de proteínas de gránulos de eosinófilos-específica (Rosenberg et al., J Exp Med 1989; 170: 163-176; Tiffany et al., J. Leukoc Biol. 1995; 58:49 - 54; Badewa et al., Exp. Biol. Med. 2002; 227:645-651).

- 15 Los eosinófilos pueden participar en las reacciones de hipersensibilidad, especialmente a través de dos mediadores de la inflamación lipídicos, los leucotrienos C⁴ (LTC⁴) y el factor activador de plaquetas (PAF). Ambos mediadores contraen el músculo liso de las vías respiratorias, promoviendo la secreción de moco, alterando la permeabilidad vascular y produciendo la infiltración de eosinófilos y neutrófilos. Además de las actividades directas de estos mediadores derivados de eosinófilos, MBP puede estimular la liberación de histamina por basófilos y mastocitos, y MBP puede estimular la liberación de la EPO por los mastocitos. Los eosinófilos pueden servir como una fuente local de mediadores lipídicos específicos, así como inducir la liberación de mediadores por los mastocitos y basófilos. El contenido del gránulo de los eosinófilos se libera después de estímulos similares a los de los gránulos de los neutrófilos, por ejemplo, durante la fagocitosis de partículas opsonizadas y por factores quimiotácticos. Las enzimas lisosomales de neutrófilos actúan principalmente sobre el material envuelto en fagolisosomas, mientras que el contenido de los gránulos de los eosinófilos actúa principalmente sobre una estructura diana extracelular, como los parásitos y los mediadores de la inflamación.

- 25 El desarrollo de monocitos y macrófagos tiene lugar en la médula ósea y pasa por las siguientes etapas: célula madre; célula madre comprometidas; monoblasto; promonocito; monocito en la médula ósea; monocito en sangre periférica; y macrófago en los tejidos. La diferenciación de los monocitos en la médula ósea sucede rápidamente (1,5 a 3 días). Durante la diferenciación, se forman los gránulos en el citoplasma de los monocitos y estos se pueden dividir como los neutrófilos en por lo menos dos tipos. Sin embargo, son menos y más pequeños que sus neutrófilos homólogos (gránulos azulófilos y específicos). Su contenido de enzima es similar.

- 35 Las enzimas unidas a gránulos de monocitos/macrófagos incluyen la lisozima, la fosfatasa ácida, y la beta-glucuronidasa. Se utilizó la secreción de lisozima por las células U937 como un modelo para los estudios in vivo. Esta línea celular deriva de un linfoma histiocítico humano y se ha usado como una línea celular monocítica que puede ser activada por una variedad de agonistas, tales como PMA (Hoff et al., J Leukoc Biol. 1992; 52: 173-182; Balboa et al., J Immunol 2003; 170:5276-5280; Sundstrom et al., Int J Cancer 1976; 17:565-577).

- 40 Las células asesinas naturales (NK) y los linfocitos citotóxicos contienen gránulos citotóxicos potentes que incluyen la perforina, una proteína formadora de poros, y las granzimas, serinproteasas específicas de linfocitos. Por ejemplo, la línea de células NK-92 es una línea humana dependiente de IL-2 establecida a partir de un paciente con linfoma no Hodgkin de progresión rápida (Gong, JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia 1994; 8:652-658). Las células NK-92 expresan altos niveles de moléculas implicadas en la ruta citolítica-perforina-granzima que se dirige a una amplia gama de células malignas (Gong et al., vide infra, y Maki T, Klingemann HG, Martinson JA, Tarn YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. J Hematother Stem Cell Res 2001; 10:369-383).

- 45 Las granzimas son serina proteasas exógenas que se liberan por los gránulos citoplasmáticos dentro de las células T citotóxicas y de células asesinas naturales. Las granzimas pueden inducir la apoptosis en las células infectadas por virus, destruyéndolas consiguientemente.

- 50 La liberación extracelular de un mediador de la inflamación (mediador de la inflamación) por los granulocitos (o leucocitos), y la liberación extracelular de más de un mediador de la inflamación (mediador de la inflamación) por los granulocitos (o leucocitos) se denominan desgranulación algunas veces en la presente memoria. En una realización preferida, la liberación de un mediador de la inflamación comprende la liberación de dicho mediador por un gránulo situado en el interior de un granulocito o de un leucocito. La liberación de mediador de la inflamación es preferiblemente la liberación de un mediador de la inflamación por estos gránulos.

- 55 Los neutrófilos y macrófagos, tras la preactivación con los agentes proinflamatorios (estimulantes de la inflamación) como el TNF α , aumentan dramáticamente la síntesis de la proteína MARCKS: hasta un 90% de la nueva proteína formada por los neutrófilos en respuesta a TNF α o a un lipopolisacárido (LPS) es MARCKS (Thelen M, Rosen A, Nairn AC, Aderem Tumor necrosis factor alpha modifies agonist-dependent responses in human neutrophils by inducing the synthesis and myristoylation of a specific protein kinase C substrate. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87:5603-5607). MARCKS puede por lo tanto tener un papel importante en la posterior liberación de mediadores de la

inflamación cuando las células que contienen gránulos, tales como neutrófilos y macrófagos, son estimuladas por agonistas, especialmente aquellos que funcionan por medio de la activación de la PKC (Burgoyne et al., *Physiol Rev* 2003; 83:581-632; Logan et al., *J Allergy Clin Immunol* 2003; 111: 923-932; Smolen et al., *Biochim Biophys Acta* 1990; 1052: 133-142; Niessen et al., *Biochim Biophys Acta* 1994; 1223:267-273; Naucler et al., *J. Leukoc Biol.* 2002; 71:701-710).

La administración de una cantidad de péptido inhibidora de la desgranulación como se describe en la presente memoria a un sitio de inflamación en un sujeto, siendo el sitio de inflamación resultado de la aparición del inicio de una enfermedad, una afección, un trauma, un cuerpo extraño, o una combinación de los mismos en el sitio de la inflamación en el sujeto, puede reducir la cantidad de mediador de la inflamación liberado por los leucocitos infiltrados en el sitio de inflamación, donde los leucocitos son preferiblemente granulocitos. La administración del péptido puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberado por leucocitos, tales como los granulocitos infiltrados en el sitio de la inflamación. La cantidad de péptido inhibidor de la desgranulación, es suficiente para reducir o inhibir la liberación por exocitosis de los mediadores de la inflamación de los gránulos contenidos dentro de las células inflamatorias infiltradas en el sitio. La eficacia de la inhibición de la desgranulación se mide después de la administración del péptido comparando el porcentaje de inhibición (es decir, porcentaje de reducción) de liberación de los mediadores de la inflamación por dichas células (leucocitos o granulocitos u otras células inflamatorias) en relación con el nivel, cantidad o concentración de dichos mediadores de la inflamación liberados o producidos en aproximadamente el mismo tiempo en ausencia del péptido. Además, un médico experto puede determinar si la inflamación en el sitio del tejido se ha reducido por medio de la medición de los síntomas y parámetros de inflamación conocidos como indicadores de la enfermedad para determinar si se ha administrado una cantidad suficiente o terapéuticamente eficaz del péptido. Una cantidad de inhibidor de la desgranulación suficiente es la cantidad que produce un porcentaje de reducción de un mediador de la inflamación liberado por un granulocito, en el sitio de la inflamación, siendo dicho porcentaje aproximadamente de 1% a aproximadamente 99%, preferiblemente de 5% a aproximadamente 99%, más preferiblemente aproximadamente de 10% a aproximadamente 99%, aún más preferiblemente aproximadamente de 25% a 99%, e incluso más preferiblemente aproximadamente de 50% a aproximadamente 99% la cantidad de dicho mediador de la inflamación liberada por dichos granulocitos en ausencia del péptido analizado las mismas condiciones.

La administración de una cantidad del péptido MANS inhibidora de la desgranulación a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal, donde el sitio de estimulación inflamatoria se ha creado por la administración de una cantidad de un estimulante inflamatorio de la inflamación en dicho sitio, puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberado por un granulocito, estando el granulocito estimulado por el estimulante de la inflamación en el sitio de estimulación inflamatoria, aproximadamente del 1% a aproximadamente 99%, preferiblemente del 5% a aproximadamente 99%, más preferiblemente aproximadamente del 10% a aproximadamente 99%, aún más preferiblemente aproximadamente del 25% a 99%, y aún más preferiblemente aproximadamente del 50% a aproximadamente 99% la cantidad de dicho mediador de la inflamación liberado por dicho granulocito en ausencia de péptido MANS en presencia de una cantidad idéntica estimuladora de la inflamación de dicho estimulador de la inflamación.

La administración de una cantidad del péptido MANS inhibidora de la desgranulación a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal, donde el sitio de estimulación inflamatoria se ha creado por la administración de una cantidad de un estimulante inflamatorio de la inflamación en dicho sitio, puede reducir la cantidad de un mediador de la inflamación liberado por un granulocito, estando el granulocito estimulado por el estimulante de la inflamación en el sitio de estimulación, en el 100% la cantidad de dicho mediador de la inflamación liberado por dicho granulocito en ausencia de péptido MANS en presencia de una cantidad idéntica estimuladora de la inflamación de dicho estimulador de la inflamación.

Un ejemplo de un estimulante de la inflamación utilizado en los ejemplos *in vitro* de la presente memoria es 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA). La proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1) es casi tan eficaz como C5a, y mucho más potente que IL-8, en la desgranulación de basófilos, dando como resultado la liberación de histamina. La liberación de histamina puede ocurrir después de la estimulación con quimiocinas (por ejemplo, citoquinas quimiotácticas), RANTES y MIP-1.

En relación con la concentración basal del péptido de MARCKS presente en el sitio de la estimulación inflamatoria, la cantidad del péptido MANS inhibidora de la desgranulación administrada a un sitio de estimulación inflamatoria en un animal comprende aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 1.000.000 de veces la concentración del péptido de MARCKS en el sitio de estimulación inflamatoria, preferiblemente aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 100.000 veces la concentración del péptido de MARCKS en el sitio de estimulación inflamatoria, más preferiblemente aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 10.000 veces la concentración el péptido de MARCKS en el sitio de estimulación inflamatoria, incluso más preferiblemente aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 1000 veces la concentración del péptido de MARCKS en el sitio de estimulación inflamatoria, incluso más preferiblemente aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 100 veces la concentración de péptido de MARCKS en el sitio de estimulación inflamatoria, y aún más preferiblemente aproximadamente de 1 vez a aproximadamente 10 veces la concentración del péptido de MARCKS en sitio de estimulación inflamatoria.

El granulocito reside sobre o dentro de las vías respiratorias de un animal, preferiblemente un humano, y el péptido MANS se puede administrar por inhalación, tal como inhalación de una composición farmacéutica que comprenda el péptido MANS, por ejemplo una composición farmacéutica que comprenda el péptido MANS y una disolución acuosa, composición la cual se administra en forma de un aerosol, o una composición farmacéutica que comprende el péptido MANS en forma de un polvo seco, composición la cual se administra utilizando un inhalador de polvo seco. Se pueden utilizar otros métodos y dispositivos conocidos en la técnica para la administración de una disolución o polvo por inhalación, tales como, por ejemplo, gotas, aerosoles, y nebulizadores.

En algunas realizaciones, es posible que el péptido del primer aspecto de la invención pueda bloquear procesos secretores que son fisiológicamente importantes, incluyendo las funciones de secreción basal. Aunque los inventores no desean estar sujetos a ninguna teoría particular de la invención, se cree que los mecanismos que regulan esta secreción basal son diferentes de los que regulan la secreción estimulada. Alternativamente, los mecanismos de secreción basal pueden requerir menos proteína MARCKS que la secreción estimulada. Se puede conservar la secreción basal puesto que todas las terapias para bloquear la secreción por medio de MARCKS no tienen porque eliminar todas funciones de MARCKS.

Tal como se utiliza en la presente memoria, el término "secuencia de nucleótidos de MARCKS" se refiere a cualquier secuencia de nucleótidos derivada de un gen que codifica una proteína MARCKS, incluidas, por ejemplo, la secuencia de ADN o de ARN, la secuencia de ADN del gen, cualquier secuencia de ARN transcrita, la secuencia del ARN del pre-ARNm o transcrito del ARNm, y ADN o ARN unido a proteína.

La administración precisa del péptido de bloqueo MARCKS también puede superar las limitaciones potenciales de bloqueo de procesos de secreción importantes. La administración de estos agentes al tracto respiratorio se debería llevar a cabo fácilmente con formulaciones inhaladas. Dado que estos agentes pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad inflamatoria del intestino, se puede suponer la administración de los agentes de bloqueo en el recto/colon/tracto intestinal por medio de un enema o supositorios. Las inyecciones intraarticulares o administración transdérmica en las articulaciones inflamadas pueden dar alivio a los pacientes con enfermedades artríticas o autoinmunes por medio de la limitación de la secreción por las células inflamatorias localizadas. La administración por inyección intrarticular o transdérmica en las articulaciones inflamadas puede producir alivio a los pacientes con enfermedades artríticas o autoinmunes al limitar la secreción de las células inflamatorias localizadas. La inyección en áreas que rodean las terminaciones nerviosas puede inhibir la secreción de algunos tipos de neurotransmisores, al bloquear la transmisión de dolor severo o los espasmos musculares incontrolables. La administración del péptido en el tratamiento de enfermedades inflamatorias de la piel se deberá llevar a cabo fácilmente utilizando diversas formulaciones tópicas conocidas en la técnica.

Se cree que MARCKS interactúa con la actina y la miosina en el citoplasma y por lo tanto puede ser capaz de anclar los gránulos al aparato contráctil celular, mediando de esta manera en el posterior movimiento de los gránulos y en la exocitosis. La secreción del mediador de la inflamación MPO por los neutrófilos también puede ser maximizada por activación de PKC y de PKG. Es posible que la MARCKS sirva como el punto de convergencia para acciones coordinadas de estas dos proteínas quinasas que controlan la secreción por compartimentos de membrana en las células inflamatorias (es decir, la secreción de MPO por neutrófilos).

La presente invención demuestra que la secreción del mediador de la inflamación MPO por neutrófilos caninos o humanos se incrementa con la activación simultánea de PKC y PKG, mientras que la activación de cualquiera de las quinasas por si sola era insuficiente para inducir una respuesta secretora máxima. Se ha documentado una respuesta secretora mejorada para PMA solo en células NHBE y en neutrófilos, como se demuestra en la presente memoria, aunque la magnitud de la respuesta era mucho menor que la observada por otros en una línea celular caliciforme de rata. Ver, Abdullah et al., *supra*. Además, aunque se informó anteriormente de que un análogo de GMPc podría inducir una secreción de mucina significativa por células epiteliales traqueales cultivadas de cobaya (Fischer et al., *supra*), debe tenerse en cuenta que esta respuesta no alcanzó niveles significativos hasta 8 h de exposición. Una respuesta secretora con un período de retardo tan largo es poco probable que sea un efecto directo y probablemente implica la síntesis de novo de proteínas en oposición a la liberación de gránulos citoplasmáticos preformados y almacenados.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención se puede usar en una formulación farmacéutica. En ciertas realizaciones, el producto farmacéutico está presente en una composición farmacéutica sólida que puede ser adecuada para la administración oral. Una composición sólida de la materia según la presente invención se puede formar y se puede mezclar con y/o diluir con un excipiente. La composición sólida de la materia también puede estar incluida en un vehículo que puede estar, por ejemplo, en forma de cápsula, bolsita, tableta, papel, u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semi-sólido, o líquido que actúa como un vehículo, transportador, o medio para la composición de la materia.

Varios excipientes adecuados son conocidos por los expertos en la técnica y pueden encontrarse en el *National Formulary*, 19: 2404-2406 (2000), la descripción de las páginas 2404 a 2406 se incorpora en la presente memoria en su totalidad. Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a, almidones, goma arábiga, silicato de calcio, celulosa microcristalina, metacrilatos, goma laca, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, y metilcelulosa. Las formulaciones de productos farmacéuticos pueden incluir adicionalmente agentes lubricantes tales

como, por ejemplo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como hidroxibenzoatos de metilo y de propilo; agentes edulcorantes; o agentes aromatizantes. Se pueden utilizar polioles, amortiguadores y cargas inertes. Los ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a, manitol, sorbitol, xilitol, sacarosa, maltosa, glucosa, lactosa, dextrosa, y similares. Los amortiguadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, fosfato, citrato, tartrato, succinato, y similares. Otras cargas inertes que se pueden utilizar incluyen los que son conocidos en la técnica y que son útiles en la fabricación de diversas formas de dosificación. Si se desea, las formulaciones sólidas pueden incluir otros componentes tales como agentes de espesantes y/o agentes de granulación, y similares. Los productos farmacéuticos de la invención pueden formularse de manera que proporcionen una liberación rápida, prolongada o retardada del ingrediente activo después de la administración al paciente empleando procedimientos bien conocidos en la técnica.

Para formar comprimidos para la administración oral, la composición de la materia de la presente invención puede ser realizada por un proceso de compresión directa. En este proceso, los ingredientes farmacológicos activos pueden mezclarse con un vehículo sólido, pulverulento tal como, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, amilopectina, derivados de celulosa o gelatina, y mezclas de los mismos, así como con un agente antifricción tal como, por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de calcio, y ceras de polietilenglicol. La mezcla se puede prensar en forma de comprimidos usando una máquina con los troqueles y matrices adecuados para obtener el tamaño de comprimido deseado. Los parámetros de funcionamiento de la máquina se pueden seleccionar por el experto en la materia. Alternativamente, los comprimidos para administración oral pueden formarse en un proceso de granulación en húmedo. Los ingredientes activos de los fármacos se pueden mezclar con excipientes y/o diluyentes. Las sustancias sólidas se pueden moler o tamizar hasta un tamaño de partícula deseado. Se puede añadir al fármaco un agente espesante. El agente espesante puede estar suspendido y homogeneizado en un disolvente adecuado. El ingrediente activo y los agentes auxiliares también se pueden mezclar con la disolución de agente espesante. La mezcla seca resultante se humedece con la disolución de manera uniforme. El humectante normalmente hace que las partículas se agreguen ligeramente, y la masa resultante se presiona a través de un tamiz de acero inoxidable que tiene un tamaño deseado. A continuación la mezcla se seca en unidades de secado controladas durante el tiempo necesario para alcanzar un tamaño y consistencia de partícula deseado. Los gránulos de la mezcla seca se tamizan para eliminar cualquier polvo. A esta mezcla se pueden añadir agentes de desintegración, antifricción, y/o anti-adhesivos. Finalmente, la mezcla se prensa en comprimidos usando una máquina con los troqueles y matrices apropiados y se le da la forma para obtener el tamaño de comprimido deseado. Los parámetros de funcionamiento de la máquina se pueden seleccionar por el experto en la materia.

Si se desean comprimidos recubiertos, el núcleo preparado anteriormente se puede recubrir con una disolución concentrada de azúcar o polímeros celulósicos, que pueden contener goma arábiga, gelatina, talco, dióxido de titanio, o con un barniz disuelto en disolvente orgánico volátil o en una mezcla de disolventes. Se pueden añadir diversos colorantes a este recubrimiento con el fin de distinguir entre comprimidos con diferentes compuestos activos o con diferentes cantidades del compuesto activo presente. En una realización particular, el ingrediente activo puede estar presente en un núcleo rodeado por una o más capas, incluyendo capas de recubrimiento entérico.

Se pueden preparar cápsulas de gelatina blandas en donde las cápsulas contengan una mezcla del ingrediente activo y un aceite vegetal. Las cápsulas de gelatina dura pueden contener gránulos del ingrediente activo en combinación con un vehículo sólido, pulverulento, tales como, por ejemplo, lactosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón de patata, almidón de maíz, amilopectina, derivados de celulosa, y/o gelatina.

Se pueden preparar preparaciones líquidas para la administración oral en forma de jarabes o suspensiones, por ejemplo, soluciones que contiene un ingrediente activo, azúcar, y una mezcla de etanol, agua, glicerol, y propilenglicol. Si se desea, tales preparaciones líquidas pueden comprender uno o más de los siguientes: agentes colorantes, agentes aromatizantes, y sacarina. También se pueden usar agentes espesantes tales como carboximetilcelulosa.

En el caso de que los productos farmacéuticos anteriores sean para uso en administración parenteral, esta formulación puede comprender disoluciones estériles para inyectar acuosas, disoluciones para inyectar no acuosas, o ambas, que comprendan la composición de la materia de la presente invención. Cuando se preparan disoluciones acuosas para inyectar, la composición de la materia puede estar presente como una sal soluble en agua farmacéuticamente aceptable. Las preparaciones parenterales pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos, y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor al que va destinado. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden comprender agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo ampollas selladas y viales. Se pueden prepara disoluciones inyectables extemporáneas y suspensiones a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente.

La composición de la materia también se puede formular de tal manera que puede ser adecuado para la administración tópica (por ejemplo, crema para la piel). Estas formulaciones pueden contener diversos excipientes conocidos por los expertos en la técnica. Los excipientes adecuados pueden incluir, pero no se limitan a, cera de cetilésteres, alcohol cetílico, cera blanca, monoestearato de glicerol, propilenglicol, monoestearato, estearato de

metilo, alcohol bencílico, lauril sulfato de sodio, glicerina, aceite mineral, agua, carbómero, alcohol etílico, adhesivos de acrilato, adhesivos de poliisobutileno y adhesivos de silicona.

5 Los fragmentos peptídicos se describen en la Tabla 2 y son de una longitud de por lo menos 4 a 23 restos de aminoácidos y tienen secuencias de aminoácidos idénticas a una secuencia de aminoácidos del péptido MANS, en donde el aminoácido N-terminal de los péptidos se selecciona de entre las posiciones 2 a 21 de la secuencia del péptido MANS (ID SEC NO: 1). La longitud de fragmento de péptido más preferida es por lo menos de 6 aminoácidos a 23 aminoácidos. Preferiblemente estos péptidos están acilados en el aminoácido alfa N-terminal, y más preferiblemente estos péptidos están miristoilados en el aminoácido en posición alfa-N-terminal

Tabla 2

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 3	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 3
péptido 5	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 5
péptido 8	AQFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 8
péptido 12	AQFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 12
péptido 17	AQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 17
péptido 23	AQFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 23
péptido 30	AQFSKTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 30
péptido 38	AQFSKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 38
péptido 47	AQFSKTAAKGEAAAEE	SEC ID NO. 47
péptido 57	AQFSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 57
péptido 68	AQFSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 68
péptido 80	AQFSKTAAKGEA	SEC ID NO. 80
péptido 93	AQFSKTAAKGE	SEC ID NO. 93
péptido 107	AQFSKTAAKG	SEC ID NO. 107
péptido 122	AQFSKTAAK	SEC ID NO. 122
péptido 138	AQFSKTAA	SEC ID NO. 138
péptido 155	AQFSKTA	SEC ID NO. 155
péptido 173	AQFSKT	SEC ID NO. 173
péptido 192	AQFSK	SEC ID NO. 192
péptido 212	AQFS	SEC ID NO. 212
péptido 6	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 6
péptido 9	QFSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 9
péptido 13	QFSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 13
péptido 18	QFSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 18
péptido 24	QFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 24
péptido 31	QFSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 31
péptido 39	QFSKTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 39
péptido 48	QFSKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 48
péptido 58	QFSKTAAKGEAAAEE	SEC ID NO. 58
péptido 69	QFSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 69
péptido 81	QFSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 81
péptido 94	QFSKTAAKGEA	SEC ID NO. 94
péptido 108	QFSKTAAKGE	SEC ID NO. 108
péptido 123	QFSKTAAKG	SEC ID NO. 123

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 139	QFSKTAAK	SEC ID NO. 139
péptido 156	QFSKTAA	SEC ID NO. 156
péptido 174	QFSKTA	SEC ID NO. 174
péptido 193	QFSKT	SEC ID NO. 193
péptido 213	QFSK	SEC ID NO. 213
péptido 10	FSKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 10
péptido 14	FSKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 14
péptido 19	FSKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 19
péptido 25	FSKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 25
péptido 32	FSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 32
péptido 40	FSKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 40
péptido 49	FSKTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 49
péptido 59	FSKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 59
péptido 70	FSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 70
péptido 82	FSKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 82
péptido 95	FSKTAAKGEAA	SEC ID NO. 95
péptido 109	FSKTAAKGEA	SEC ID NO. 109
péptido 124	FSKTAAKGE	SEC ID NO. 124
péptido 140	FSKTAAKG	SEC ID NO. 140
péptido 157	FSKTAAK	SEC ID NO. 157
péptido 175	FSKTAA	SEC ID NO. 175
péptido 194	FSKTA	SEC ID NO. 194
péptido 214	FSKT	SEC ID NO. 214
péptido 15	SKTAAKGEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 15
péptido 20	SKTAAKGEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 20
péptido 26	SKTAAKGEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 26
péptido 33	SKTAAKGEAAAERPGEA	SEC ID NO. 33
péptido 41	SKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 41
péptido 50	SKTAAKGEAAAERPGE	SEC ID NO. 50
péptido 60	SKTAAKGEAAAERP	SEC ID NO. 60
péptido 71	SKTAAKGEAAAER	SEC ID NO. 71
péptido 83	SKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 83
péptido 96	SKTAAKGEAAA	SEC ID NO. 96
péptido 110	SKTAAKGEAA	SEC ID NO. 110
péptido 125	SKTAAKGEA	SEC ID NO. 125
péptido 141	SKTAAKGE	SEC ID NO. 141
péptido 158	SKTAAKG	SEC ID NO. 158
péptido 176	SKTAAK	SEC ID NO. 176
péptido 195	SKTAA	SEC ID NO. 195
péptido 215	SKTA	SEC ID NO. 215

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 21	KTAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 21
péptido 27	KTAAKGEEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 27
péptido 34	KTAAKGEEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 34
péptido 42	KTAAKGEEAAAERPGEA	SEC ID NO. 42
péptido 51	KTAAKGEEAAAERPGE	SEC ID NO. 51
péptido 61	KTAAKGEEAAAERPG	SEC ID NO. 61
péptido 72	KTAAKGEEAAAERP	SEC ID NO. 72
péptido 84	KTAAKGEEAAAER	SEC ID NO. 84
péptido 97	KTAAKGEEAAAEE	SEC ID NO. 97
péptido 111	KTAAKGEEAAA	SEC ID NO. 111
péptido 126	KTAAKGEEAA	SEC ID NO. 126
péptido 142	KTAAKGEEA	SEC ID NO. 142
péptido 159	KTAAKGEE	SEC ID NO. 159
péptido 177	KTAAKGE	SEC ID NO. 177
péptido 196	KTAAK	SEC ID NO. 196
péptido 216	KTAA	SEC ID NO. 216
péptido 28	TAAKGEEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 28
péptido 35	TAAKGEEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 35
péptido 43	TAAKGEEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 43
péptido 52	TAAKGEEAAAERPGEA	SEC ID NO. 52
péptido 62	TAAKGEEAAAERPGE	SEC ID NO. 62
péptido 73	TAAKGEEAAAERPG	SEC ID NO. 73
péptido 85	TAAKGEEAAAERP	SEC ID NO. 85
péptido 98	TAAKGEEAAAER	SEC ID NO. 98
péptido 112	TAAKGEEAAAEE	SEC ID NO. 112
péptido 127	TAAKGEEAAA	SEC ID NO. 127
péptido 143	TAAKGEEAA	SEC ID NO. 143
péptido 160	TAAKGEEA	SEC ID NO. 160
péptido 178	TAAKGEE	SEC ID NO. 178
péptido 197	TAAKGE	SEC ID NO. 197
péptido 217	TAAK	SEC ID NO. 217
péptido 36	AAKGEEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 36
péptido 44	AAKGEEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 44
péptido 53	AAKGEEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 53
péptido 63	AAKGEEAAAERPGEA	SEC ID NO. 63
péptido 74	AAKGEEAAAERPGE	SEC ID NO. 74
péptido 86	AAKGEEAAAERPG	SEC ID NO. 86
péptido 99	AAKGEEAAAERP	SEC ID NO. 99
péptido 113	AAKGEEAAAER	SEC ID NO. 113
péptido 128	AAKGEEAAAEE	SEC ID NO. 128

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 144	AAKGEGAAA	SEC ID NO. 144
péptido 161	AAKGEGAA	SEC ID NO. 161
péptido 179	AAKGEGEA	SEC ID NO. 179
péptido 198	AAKGEGE	SEC ID NO. 198
péptido 218	AAKGEG	SEC ID NO. 218
péptido 45	AKGEGAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 45
péptido 54	AKGEGAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 54
péptido 64	AKGEGAAAERPGEAA	SEC ID NO. 64
péptido 75	AKGEGAAAERPGEA	SEC ID NO. 75
péptido 87	AKGEGAAAERPGE	SEC ID NO. 87
péptido 100	AKGEGAAAERPGE	SEC ID NO. 100
péptido 114	AKGEGAAAERP	SEC ID NO. 114
péptido 129	AKGEGAAAER	SEC ID NO. 129
péptido 145	AKGEGAAAEE	SEC ID NO. 145
péptido 162	AKGEGAAA	SEC ID NO. 162
péptido 180	AKGEGEAA	SEC ID NO. 180
péptido 199	AKGEGEA	SEC ID NO. 199
péptido 219	AKGEGE	SEC ID NO. 219
péptido 55	KGEGAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 55
péptido 65	KGEGAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 65
péptido 76	KGEGAAAERPGEAA	SEC ID NO. 76
péptido 88	KGEGAAAERPGEA	SEC ID NO. 88
péptido 101	KGEGAAAERPGE	SEC ID NO. 101
péptido 115	KGEGAAAERPGE	SEC ID NO. 115
péptido 130	KGEGAAAERP	SEC ID NO. 130
péptido 146	KGEGAAAER	SEC ID NO. 146
péptido 163	KGEGAAAEE	SEC ID NO. 163
péptido 181	KGEGAAA	SEC ID NO. 181
péptido 200	KGEGEAA	SEC ID NO. 200
péptido 220	KGEGEA	SEC ID NO. 220
péptido 66	GEAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 66
péptido 77	GEAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 77
péptido 89	GEAAAERPGEAA	SEC ID NO. 89
péptido 102	GEAAAERPGEA	SEC ID NO. 102
péptido 116	GEAAAERPGE	SEC ID NO. 116
péptido 131	GEAAAERPGE	SEC ID NO. 131
péptido 147	GEAAAERP	SEC ID NO. 147
péptido 164	GEAAAER	SEC ID NO. 164
péptido 182	GEAAAEE	SEC ID NO. 182
péptido 201	GEAAA	SEC ID NO. 201

ES 2 488 092 T3

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 221	GEAA	SEC ID NO. 221
péptido 78	EAAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 78
péptido 90	EAAAERPGEAAV	SEC ID NO. 90
péptido 103	EAAAERPGEAA	SEC ID NO. 103
péptido 117	EAAAERPGEA	SEC ID NO. 117
péptido 132	EAAAERPGE	SEC ID NO. 132
péptido 148	EAAAERPG	SEC ID NO. 148
péptido 165	EAAAERP	SEC ID NO. 165
péptido 183	EAAAER	SEC ID NO. 183
péptido 202	EAAAE	SEC ID NO. 202
péptido 222	EAAA	SEC ID NO. 222
péptido 91	AAAERPGEAAVA	SEC ID NO. 91
péptido 104	AAAERPGEAAV	SEC ID NO. 104
péptido 118	AAAERPGEAA	SEC ID NO. 118
péptido 133	AAAERPGEA	SEC ID NO. 133
péptido 149	AAAERPGE	SEC ID NO. 149
péptido 166	AAAERPG	SEC ID NO. 166
péptido 184	AAAERP	SEC ID NO. 184
péptido 203	AAAER	SEC ID NO. 203
péptido 223	AAAE	SEC ID NO. 223
péptido 105	AAERPGEAAVA	SEC ID NO. 105
péptido 119	AAERPGEAAV	SEC ID NO. 119
péptido 134	AAERPGEAA	SEC ID NO. 134
péptido 150	AAERPGEA	SEC ID NO. 150
péptido 167	AAERPGE	SEC ID NO. 167
péptido 185	AAERPG	SEC ID NO. 185
péptido 204	AAERP	SEC ID NO. 204
péptido 224	AAER	SEC ID NO. 224
péptido 120	AERPGEAAVA	SEC ID NO. 120
péptido 135	AERPGEAAV	SEC ID NO. 135
péptido 151	AERPGEAA	SEC ID NO. 151
péptido 168	AERPGEA	SEC ID NO. 168
péptido 186	AERPGE	SEC ID NO. 186
péptido 205	AERPG	SEC ID NO. 205
péptido 225	AERP	SEC ID NO. 225
péptido 136	ERPGEAAVA	SEC ID NO. 136
péptido 152	ERPGEAAV	SEC ID NO. 152
péptido 169	ERPGEAA	SEC ID NO. 169
péptido 187	ERPGEA	SEC ID NO. 187
péptido 206	ERPGE	SEC ID NO. 206

Péptido No.	Secuencia	Secuencia ID No.
péptido 226	ERPG	SEC ID NO. 226
péptido 153	RPGEAAVA	SEC ID NO. 153
péptido 170	RPGEAAV	SEC ID NO. 170
péptido 188	RPGEAA	SEC ID NO. 188
péptido 207	RPGEA	SEC ID NO. 207
péptido 227	RPGE	SEC ID NO. 227
péptido 171	PGEEAAVA	SEC ID NO. 171
péptido 189	PGEEAAV	SEC ID NO. 189
péptido 208	PGEEA	SEC ID NO. 208
péptido 228	PGEA	SEC ID NO. 228
péptido 190	GEEAAVA	SEC ID NO. 190
péptido 209	GEEAAV	SEC ID NO. 209
péptido 229	GEAA	SEC ID NO. 229
péptido 210	EAAVA	SEC ID NO. 210
péptido 230	EAAV	SEC ID NO. 230
péptido 231	AAVA	SEC ID NO. 231

Como se ilustra en la figura. 5, MARCKS se fosforila por PKC y, en consecuencia se transloca desde la membrana hasta el citoplasma. Aquí, PKG parece inducir la desfosforilación de MARCKS (FIG 2A, carril 4, y FIG 2B). Esta desfosforilación se invirtió por el inhibidor de PKG R_p-8-Br-PET-GMPc (figura 2A, carril 5), lo que indica la desfosforilación era específicamente dependiente de PKG. En la FIG. 2, las células NHBE se marcaron con [³²P] ortofosfato y luego se expusieron a los reactivos indicados. Se evaluó la fosforilación de MARCKS en respuesta a los tratamientos por ensayo de inmuno precipitación. En la FIG 2A, 8-Br-GMPc invierte la fosforilación de MARCKS inducida por PMA, y este efecto de 8-Br-GMPc podría ser bloqueado por R_p-8-Br-PET-GMPc (PKG inhibidor) o el ácido okadoico (inhibidor de PP1/2A). En la FIG 2B, la fosforilación MARCKS inducida por PMA se invirtió por la subsiguiente exposición de las células a 8-Br-GMPc. El carril 1, solo medio durante 8 min; carril 2, 100 nM de PMA durante 3 min; carril 3, 100 nM de PMA durante 3 min y después con 1 μM 8-Br-GMPc durante 5 min; carril 4, 100 nM de PMA durante 8 min; carril 5, medio solo durante 3 min y luego 100 nM de PMA + 1 μM de 8-Br-GMPc durante 5 min. En la FIG 2C, la desfosforilación de MARCKS inducida por 8-Br-GMPc fue atenuada por fostriecina de una manera dependiente de la concentración.

Se cree que PKG actúa para desfosforilar a MARCKS por vía de la activación de una proteína fosfatasa. Como se ilustra en la FIG. 2A (carril 6), el ácido okadoico a 500 nM, una concentración que pudiera inhibir a PP1 y PP2A, bloquea la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG, lo que sugiere que PKG causa la desfosforilación por medio de la activación de PP1 y/o PP2A. Otros estudios con fostriecina y el ensayo directo de las actividades de la fosfatasa indicaron que sólo PP2A se activaba con PKG y era responsable de la eliminación de los grupos fosfato de MARCKS (FIG. 2C). Es probable que, o bien el ácido okadoico o la fostriecina, a concentraciones que inhiben la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG, atenúan la secreción de mucina inducida por PMA+8-Br-GMPc o UTP según se muestra en la FIG. 3. La FIG. 3 ayuda a demostrar que PP2A es un componente esencial de la ruta secretora de mucina. Se pre incubaron células NHBE con la concentración indicada de fostriecina, ácido okadoico (500 nM), o solo medio durante 15 min y después se estimularon con PMA (100 nM)+8- Br-GMPc (1 μM) durante 15 min o con UTP (100 μM) durante 2 horas. Se midió la Mucina secretada por ELISA. Los datos se presentan como el promedio + -. S. E. (n=6 en cada punto) en donde * representa significativamente diferente del medio control (p<0,05); † representa significativamente diferente de la estimulación con PMA+8-Br-GMPc (p <0,05); y ‡ representa significativamente diferente de la estimulación con UTP p <0,05). Por lo tanto, la desfosforilación de MARCKS por PP2A activadas con PKG parece ser un componente esencial de la ruta de señalización que conduce a la exocitosis de los gránulos de mucina.

Para revelar eventos moleculares por los que MARCKS vincula la activación de la quinasa a la secreción de mucina, se investigó en profundidad la fosforilación de MARCKS en respuesta a la activación con PKC/PKG. Como se ilustra en la FIG. 1A, PMA (100 nM) probablemente indujo un aumento significativo (3 a 4 veces) la fosforilación de MARCKS en las células NHBE, y esta fosforilación fue atenuada por PKC inhibidor de la calfoestina C (500 nM). Una vez fosforilada, MARCKS se transloca de la membrana plasmática al citoplasma (FIG. 1B). Más específicamente, la FIG. 1A muestra la activación de PKC que tiene como resultado la fosforilación de MARCKS en células NHBE. Las células se marcaron con [³²P] ortofosfato durante 2 h y luego se exponen a los reactivos estimulantes y/o inhibidores.

La fosforilación de MARCKS en respuesta a los tratamientos se evaluó mediante inmuno precipitación tal como se ha descrito. Carril 1, medio control; carril 2 vehículo, 0,1% Me.sub.2SO; carril 3, 100 nM 4 de α -PMA; carril 4, 100 nM de PMA; carril 5, 100 nM de PMA+ 500 nM de calfofostina C; carril 6, 500 nM de calfofostina C. La FIG. 1B demuestra que MARCKS fosforilada se transloca desde la membrana plasmática al citoplasma. Las células etiquetadas con ^{32}P fueron expuestas a PMA (100 nM) o solo medio durante 5 min, y a continuación, se aislaron la membrana y las fracciones de citosol. La activación de PKG con 8-Br-GMPc (1 μM , otro evento de activación de la quinasa necesario para provocar la secreción de mucina, no dio lugar a la fosforilación de o MARCKS, sino que de hecho, se observó el efecto contrario: la fosforilación MARCKS inducida por PMA se invirtió con 8-Br-GMPc (FIG. 2A). Este efecto de 8-Br-GMPc no era debido a la supresión de la actividad de PKC, puesto que la fosforilación inducida con PMA podría ser revertida por la adición posterior de 8-Br-GMPc a las células (FIG. 2B). Por lo tanto, la activación de PKG dio como resultado probablemente la desfosforilación de MARCKS.

La investigación posterior demostró que la desfosforilación de MARCKS inducida con PKG fue bloqueada por ácido okadaico 500 nM, una inhibidor de la proteína fosfatasa (de tipo 1 y/o 2A (PP 1/2A)) (FIG 2A, carril 6). Por lo tanto, parecía que la desfosforilación estaba mediada por PP1 y/o PP2A. Para definir el subtipo de proteína fosfatasa implicada, se utilizó un nuevo y inhibidor más específico de PP2A, la fostriecina ($\text{IC}_{50}=3,2$ nM), en estudios de fosforilación adicionales. Como se ilustra en la FIG. 2C, la fostriecina inhibió la desfosforilación de MARCKS inducida por PKG de una manera dependiente de la concentración (1-500 nM), lo que sugiere que PKG induce la desfosforilación a través de la activación de PP2A. Para confirmar aún más la activación de PP2A por PKG en las células NHBE, se determinaron las actividades citosólicas de PPL y PP2A tras la exposición de las células a 8-Br-GMPc. La actividad de PP2A se aumentó aproximadamente 3 veces (de 0,1 a 0,3 nmol/ min/mg de proteínas, $p<0,01$) en concentraciones de 8-Br-GMPc tan bajas como 0,1 μM , mientras que la actividad de PPI se mantuvo sin cambios. Estos datos indican que la PP2A puede ser activada por PKG y es responsable de la desfosforilación de MARCKS. En consecuencia, esta actividad de PP2A pareció ser crítica para que se produzca la secreción de mucina; cuando la desfosforilación de MARCKS inducida con PKG fue bloqueada por el ácido okadaico o fostriecina, se mejoró la respuesta secretora a la activación por PKC/PKG o la estimulación con UTP (FIG. 3).

MARCKS asociada con actina y miosina en el citoplasma

La FIG. 4 representa un ensayo de inmuno precipitación radiomarcada que revela que MARCKS se puede asociar con otras dos proteínas (aproximadamente 200 y aproximadamente 40 kDa) en el citoplasma. En la FIG. 4 las células NHBE se marcaron con leucina y [^3H] prolina durante la noche, y la membrana y las fracciones de citosol se prepararon como se describe en "*Experimental Procedures*". Las fracciones aisladas se aclararon previamente con el anticuerpo de control no inmune (6F6). A continuación, el citosol se dividió igualmente en dos fracciones y se utilizó para la inmuno precipitación llevada a cabo en presencia de citocalasina D 10 [μM] (Biomol, Plymouth Meeting, PA) con el anticuerpo anti-MARCKS 2FI 2 (carril 2) y el anticuerpo de control no inmune 6F6 (carril 3), respectivamente. La proteína MARCKS en la fracción de membrana también se evaluó mediante inmuno precipitación utilizando el anticuerpo 2FI 2 (carril 1). El complejo de proteína precipitada se resolvió por electroforesis en gel de poliacrilamida con 8% SDS y se visualizó por autorradiografía mejorada. MARCKS parecía estar asociada con dos proteínas citoplasmáticas con masas moleculares aproximadamente de 200 y aproximadamente 40 kDa, respectivamente. Estas dos proteínas asociadas con MARCKS se escindieron del gel y se analizaron por espectroscopía de masa laser de desorción/ionización asistida por matriz /tiempo de vuelo/secuenciación interna (the Protein/ADN Technology Center of Rockefeller University, N.Y.). La masa del péptido obtenida y los datos de las secuencias se utilizaron para buscar en bases de datos de proteínas a través de los programas de Internet ProFound y MS-Fit. Los resultados indican que son miosina (cadena pesada, de tipo A no muscular) y actina, respectivamente. El análisis por espectroscopía de masa laser de desorción/ionización asistida por matriz /tiempo de vuelo/secuenciación interna indica que estas dos proteínas asociadas con MARCKS fueron miosina (cadena pesada, de tipo A no muscular) y actina, respectivamente.

Estos estudios sugieren un nuevo paradigma en el mecanismo de señalización que controla la secreción exocitótica de los gránulos de mucina en las vías respiratorias, y proporciona así mismo lo que se cree que es la primera evidencia directa que demuestra una función biológica específica de MARCKS en un proceso fisiológico. MARCKS actúa como una molécula mediadora clave que regula la liberación de gránulos de mucina en las células epiteliales de las vías respiratorias humanas. Se cree que la elicitación de la secreción de mucina de las vías respiratorias requiere de una doble activación y de acciones sinérgicas de PKC y PKG. La MARCKS fosforilada activada con PKC, tiene como resultado la translocación de MARCKS desde la cara interna de la membrana plasmática al citoplasma. La activación de PKG a su vez activa PP2A, que desfosforila a MARCKS en el citoplasma. Debido a que la capacidad de asociación a la membrana de MARCKS es dependiente de su estado de fosforilación esta desfosforilación puede permitir a MARCKS recuperar su capacidad de unión a la membrana y puede permitir que MARCKS se una a las membranas de los gránulos de mucina citoplasmáticos. También por interactuar con la actina y la miosina en el citoplasma (FIG. 4), MARCKS puede entonces ser capaz de anclar los gránulos al aparato contráctil celular, participando en el movimiento gránulo a la periferia de la célula y en la liberación de exocitosis posterior. La amplia distribución de MARCKS sugiere la posibilidad de que éste o un mecanismo similar puedan regular la secreción de los gránulos unidos a la membrana en diversos tipos de células en condiciones normales o patológicas.

Como se indica en la FIG. 5, MARCKS puede funcionar como un enlace molecular por la interacción con las membranas de los gránulos en su dominio N-terminal y la unión a los filamentos de actina en su sitio PSD, vinculando de ese modo los gránulos a la inmovilización al citoesqueleto contráctil para el movimiento y la exocitosis. La FIG. 5 muestra un posible mecanismo que representa que el secretagogo de mucina interactúa con las células epiteliales de las vías aéreas (caliciformes) y activa dos proteínas quinasas diferentes, PKC y PKG. La PKC activada fosforila a MARCKS, causando la translocación de MARCKS de la membrana plasmática al citoplasma, mientras que PKG, activada a través de la ruta del óxido nítrico (NO) → GC-S → cGMP → PKG, a su vez activa una PP2A citoplasmática, que desfosforila a MARCKS. Esta desfosforilación estabiliza la unión de MARCKS a las membranas de los gránulos. Además, MARCKS también interactúa con la actina y la miosina, vinculando así los gránulos a la maquinaria celular contráctil para el movimiento posterior y la liberación exocitótica de los mediadores de la inflamación, tal como la MPO. La unión de MARCKS a los gránulos después de liberarse al citoplasma también puede ser guiada por las proteínas diana o algunas otras formas de interacciones proteína-proteína en las que el dominio N-terminal de MARCKS está involucrado. En cualquier caso, el péptido de MANS, o un fragmento activo del mismo, que comprende por lo menos 4 aminoácidos, actuarían inhibiendo competitivamente la unión de MARCKS a las dianas de las membranas de los gránulos de mucina, bloqueando de este modo la secreción.

La invención se basa en el uso de los péptidos del primer aspecto de la invención para el bloqueo de cualquier proceso de secreción de exocitosis celular, especialmente aquellos relacionados con la liberación de mediadores de la inflamación a partir de gránulos contenidos dentro de las células inflamatorias, cuyas rutas estimuladoras implicar a la proteína MARCKS sustrato de la proteína quinasa C (PKC) y la liberación de los contenidos de vesículas unidas a la membrana. Específicamente, los inventores han demostrado que la liberación estimulada de la mieloperoxidasa mediadora de la inflamación de los neutrófilos humanos (FIG. 6) o caninos (FIG. 7) se puede bloquear de una manera dependiente de la concentración por el péptido de MANS. Específicamente, la FIG. 6 muestra neutrófilos aislados que se estimularon para secretar mieloperoxidasa (MPO) con 100 nM de PMA y 10 μ M de 8-Br-GMPc. 100 μ M del péptido de MANS disminuyen la secreción de MPO para controlar los niveles (*=p<0,05). 10 μ M de MANS provocan una ligera disminución en la secreción de MPO. 10 o 100 μ M de un péptido control (RNS) no tiene ningún efecto sobre la secreción de MPO. En la FIG. 7, neutrófilos aislados fueron estimulados para segregar mieloperoxidasa (MPO) con 100 nM de PMA y 10 μ M de 8-Br-GMPc. 100 μ M del péptido de MANS disminuye la secreción de MPO para controlar los niveles (*=p<0,05). 10 μ M de MANS provoca una ligera disminución en la secreción de MPO. 10 o 100 μ M de un péptido de control (RNS) no tiene ningún efecto sobre la secreción de MPO. Por lo tanto, el péptido puede ser usado terapéuticamente para bloquear la liberación de mediadores de la inflamación secretados por la infiltración de células inflamatorias en cualquier tejido. Muchos de estos mediadores liberados son responsables del extenso daño tisular observado en una variedad de enfermedades inflamatorias crónicas (es decir, enfermedades respiratorias tales como el asma, bronquitis crónica y EPOC, enfermedades inflamatorias del intestino incluyendo colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunes, enfermedades de la piel tales como la rosácea, el eccema, y el acné grave, síndromes artríticos y del dolor tales como la artritis reumatoide y la fibromialgia). Los péptidos se describen para el uso en el tratamiento de enfermedades tales como artritis, bronquitis crónica, EPOC y la fibrosis quística. Para el tratamiento de enfermedades humanas y animales, especialmente los que afectan a equinos, caninos, felinos, y otros animales domésticos.

Las FIGS. 8-12 muestran la secreción de MPO en humanos y caninos. En todos estos experimentos, los neutrófilos aislados se estimularon con LPS a una concentración de 1×10^6 M durante 10 minutos a 37°C previa a la adición de los estímulos como se indica en las figuras. El LPS activa las células para que puedan responder a un secretagogo.

En respuesta a la activación de la proteína quinasa C (PKC) por un estimulante inflamatorio, se puede atenuar la desgranulación en una célula seleccionada del grupo que consiste en neutrófilos, eosinófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos por pre-incubación y por co-incubación con un péptido idéntico a la región N-terminal de la proteína MARCKS, en donde el péptido se selecciona del grupo de fragmentos del péptido MANS como se describe en la Tabla 1. Aunque los regímenes de tiempo y las concentraciones pueden variar entre los tipos de células, en todos los casos el péptido de MANS atenúa la desgranulación inducida por PKC.

Habiendo descrito ahora la invención, la misma se ilustrará con referencia a ciertos ejemplos, que se incluyen únicamente con el fin de ilustrar, y que no se pretende que sean limitativos de la invención.

Ejemplos

Métodos y Materiales

Ensayo de inmunoprecipitación con radiomarcado—Cuando se marcaron con [³P] fosfato, las células fueron incubadas previamente durante 2 h en medio Eagle modificado de Dulbecco sin fosfato que contiene 0,2% de albúmina sérica bovina y marcado con 0,1 mCi/ml [³²P]ortofosfato (9000 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) durante 2 horas. Para el marcaje con [³H] ácido mirístico o ³H aminoácidos, las células se incubaron durante la noche en un medio que contenía 50 μ Ci/ml de [³H] ácido mirístico (49 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) o 0,2 mCi/ml de [³H] leucina (159 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences) más 0,4 mCi/ml de [³H] prolina (100 Ci/mmol, PerkinElmer Life Sciences). Después del marcaje, las células fueron expuestas a los reactivos estimulantes durante 5 min. Cuando se usó un inhibidor, las células se incubaron previamente con el inhibidor durante 15 min antes de la

estimulación. Al final de los tratamientos, las células se lisaron en un amortiguador que contiene 50 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de benzamidina, 10 µg/ml de pepstatina A, y 10 µg/ml de leupeptina. La precipitación con ácido tricloroacético y el recuento de centelleo pueden determinar la eficiencia de radiomarcaje en cada cultivo. La inmunoprecipitación de la proteína MARCKS se obtuvo de acuerdo con el método de Spizz y Blackshear usando lisados de células que contienen los recuentos de iguales/min. Spizz et al., J. Biol. Chem. 271, 553-562 (1996). Las proteínas precipitadas se resolvieron por electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS 8% y se visualizaron por autorradiografía. En este ensayo se utilizaron anticuerpos MARCKS anti-humano (2F12) y anticuerpos de control no inmune (6F6).

Para valorar MARCKS o complejos de proteínas asociadas con MARCKS en diferentes fracciones subcelulares, se desprendieron células radiomarcadas y tratadas en un amortiguador de homogeneización (Tris-HCl 50 (pH 7,5), 1 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1 mM de benzamidina, 10 µg/ml de pepstatina A, 10 µg/ml de leupeptina) y posteriormente fragmentadas por cavitación con nitrógeno (800 libras/pulgada cuadrada durante 20 min a 4°C). Los lisados celulares se centrifugaron a 600 x g durante 10 min a 4°C para eliminar los núcleos y las células sin romper. Los sobrenadantes post-nucleares se separaron en las fracciones de membrana y el citosol por ultracentrifugación a 400.000 x g durante 30 min a 4°C. El sedimento de membrana se solubilizó en el amortiguador de lisis por sonicación. A continuación, se llevó a cabo la inmunoprecipitación como se describe anteriormente.

Péptidos relacionados con MARCKS – Tanto los péptidos de secuencia N-terminal miristoilada (MANS) como los de secuencia N-terminal aleatoria (RNS) se sintetizaron por Genemed Synthesis, Inc. (San Francisco, California), después se purificaron por cromatografía líquida de alta presión (>95% de pureza), y se confirmaron por espectroscopia de masas mostrando cada uno un único pico con una masa molecular apropiada. El péptido de MANS consistió en una secuencia idéntica a los primeros 24 aminoácidos de MARCKS, es decir, la región N-terminal miristoilada que interviene en la inserción de MARCKS en las membranas, MA-GAQFSKTAAGKGEAAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1 (donde MA es la cadena de miristoilo del N-terminal)). El péptido control correspondiente (RNS) contenía la misma composición de aminoácidos que MANS pero dispuestos en un orden aleatorio, MA-GTAPAAEGAGAEVKRASAEAKQAF. (SEC ID NO: 232). La presencia del resto hidrófobo de miristato en estos péptidos sintéticos aumenta la permeabilidad para la membrana plasmática, permitiendo que los péptidos sean absorbidos fácilmente por las células. Para determinar los efectos de estos péptidos en la secreción de mucina, las células se incubaron previamente con los péptidos durante 15 minutos antes añadir los secretagogos, y se midió entonces la secreción de mucina por ELISA.

Oligonucleótidos antisentido- Se sintetizaron los oligonucleótidos antisentido de MARCKS y su correspondiente oligonucleótido de control por Biognostik GmbH (Göttingen, Alemania). Las células NHBE se trataron apicalmente con 5 µM de oligonucleótido antisentido o control durante 3 días (en presencia de 2 µg/ml de lipofectina durante las primeras 24 h). Las células se incubaron entonces con secretagogos, y se midió la secreción de mucina por ELISA. Se aislaron el ARN total y las proteínas de las células tratadas. El ARNm de MARCKS se valoró por medio de hibridación Northern de acuerdo con procedimientos convencionales usando ADNc de MARCKS humana como sonda. El nivel de la proteína MARCKS se determinó por Western blot utilizando IgG1 anti-MARCKS purificado (clon 2F12) como anticuerpo de detección primaria.

Transfección transitoria- El dominio del sitio de fosforilación (PSD) de MARCKS contiene los sitios de fosforilación dependiente de PKC y el sitio de unión de los filamentos de actina. Para construir un ADNc de MARCKS con delección de PSD, se generaron dos fragmentos que flanquean la secuencia PSD (que codifica para 25 aminoácidos) por reacción en cadena de la polimerasa y después se ligaron a través del sitio XhoI que se une a los extremos 5' de los cebadores de oligonucleótidos diseñados para la reacción en cadena de la polimerasa. El ADNc mutante resultante y el ADNc de MARCKS de tipo silvestre se insertaron cada uno en un vector de expresión de mamífero pcADN4/TO (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se confirmaron las construcciones recombinantes aisladas por digestión de restricción y secuenciación de ADN.

HBE1 es una línea celular del virus del papiloma humano transformada del epitelio bronquial de células capaces secretar mucina cuando se cultivan en interfaz aire/líquido. La transfección de las células HBE1 se llevó a cabo utilizando el reactivo de transfección Effectene (Qiagen, Valencia, CA) según las instrucciones del fabricante. En resumen, las células HBE1 diferenciadas cultivadas en la interfaz aire/líquido se disociaron con tripsina/EDTA y se re-sembraron en placas de cultivo de 12 pocillos con 1×10^5 células/cm². Después de la incubación durante la noche, las células fueron transfectadas con el ADNc de tipo salvaje de MARCKS, el ADNc de MARCKS con la PSD truncada, o con ADN del vector. Las células se cultivaron durante 48 h para permitir la expresión del gen y luego se expusieron a los secretagogos y se midió la secreción de mucina por ELISA. Todas las transfecciones se llevaron a cabo en presencia de plásmido pcADN4/TO/lacZ (Invitrogen) (relación de ADN 6:1, total de 1 µg de ADN, proporción de ADN y reactivo Effectene = 1:25) para controlar las variaciones en la eficacia de la transfección. Los resultados no mostraron diferencias significativas en las actividades de la .Beta.-galactosidasa en los lisados de células aisladas a partir de las células transfectadas, lo que indica una eficacia de transfección similar entre los diferentes constructos de ADN (datos no mostrados).

Ensayo de actividad de la proteína fosfatasa- Se midió la actividad de PP1 y PP2A usando un sistema de ensayo de la proteína fosfatasa (Life Technologies, Inc.) conocido en la técnica con una ligera modificación. Huang et al. Adv. Exp. Med Biol. 396, 209-215 (1996). En resumen, las células NHBE se trataron con 8-Br-GMPc o solo con medio durante 5 min. Las células se desprendieron en un amortiguador de lisis (50 mM de Tris-HCl (pH 7,4), 0,1% de .beta.-mercaptoetanol, 0,1 mM de EDTA, 1 mM de benamidina, 10 µg/ml de pepstatina A, 10 µg/ml de leupeptina) y se rompieron por sonicación durante 20 s a 4°C. Los lisados celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se guardaron para el ensayo de actividad de la fosfatasa. El ensayo se realizó usando fosforilasa marcada con ³²P como sustrato. Se hizo el recuento del ³²P liberado por centelleo. Se determinó la concentración de proteína de cada muestra por el ensayo de Bradford. La actividad de PP2A se expresó como la actividad fosfatasa total de la muestra menos la actividad restante en presencia de 1 nM de ácido okadaico. La actividad PPI se expresó como la diferencia entre la actividad restante en presencia de 1 nM de ácido okadaico y de 1µM de ácido okadaico, respectivamente. Las actividades de la proteína fosfatasa se expresaron como nmol de P_i liberada por min/mg de proteína total.

Ensayo de citotoxicidad - Se examinaron todos los reactivos utilizados en el tratamiento de las células NHBE para la citotoxicidad midiendo la liberación total de lactato deshidrogenasa de las células. El ensayo se llevó a cabo utilizando el Kit de Promega Cytotox 96 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos se realizaron con los reactivos a concentraciones no citotóxicas.

Análisis Estadístico- Los datos fueron analizados para su significación usando análisis de varianza unidireccional con correcciones de Bonferroni posteriores a la prueba. Las diferencias entre tratamientos se consideraron significativas con p <0,05.

Aislamiento de PMN de sangre de caninos - Los pasos a seguir en el aislamiento de PMN incluyen la recolección de 10 ml de ACD de sangre anticoagulada. Posteriormente extender capas de 5 ml en 3,5 ml del medio de aislamiento PMN asegurándose de que el medio de aislamiento PMN (IM) estaba a temperatura ambiente (RI). A continuación, la sangre se centrifugó a temperatura ambiente durante 30', 550 X g a 1700 RPM. La banda baja blanca inferior se transfirió a un tubo de centrifuga cónico (CCFT) de 15 ml. A continuación, se añadieron 2V de HBBS con suero bovino fetal (PBS) al 10% y se centrifugó a temperatura ambiente durante 10', 400 X g a 1400 RPM. El sedimento se volvió a suspender en 5 ml de HBBS con PBS. Se añadió la suspensión celular a 50 ml de CCFT que contiene 20 ml de hielo frío 0,88% de NH₄Cl y se invirtió dos o tres veces. El producto resultante se centrifugó durante 10', 800 X g a 2000 RPM, posteriormente se aspiró y se volvió a suspender en 5 ml de HBSS con FBS. La preparación se analizó por recuento y citospin y preferiblemente para la sangre completa, el número de células debería estar entre 10⁹-10¹¹ células y para los PMN, el número de células debe estar entre 2-4 x 10⁷ células. Véase, normalmente, Wang et al, J. Immunol, "Neutrophilinduced changes in the biomechanical properties of endothelial cells: roles of ICAM-1 and reactive oxygen species," 6487-94 (2000).

Ensayo colorimétricos de enzimas MPO- Las muestras se analizaron para determinar la actividad de MPO en 96 placas de microtitulación de fondo redondo usando un kit de ELISA sándwich (R & D Systems, Minneapolis, Minn). En resumen, se mezclaron 20 microlitros de muestra con 180 microlitros de mezcla de sustrato que contiene 33 mM de fosfato de potasio, pH 6,0, 0,56% de Triton X-100, 0,11 mM de peróxido de hidrógeno, y 0,36 mM de O-Diannisidine Diclorhidrato de microtitulación en un individuo bien. Las concentraciones finales en la mezcla de ensayo son: fosfato de potasio 30 mM, pH 6,0, 0,05% de Triton X-100, 0,1 mM de peróxido de hidrógeno, y 0,32 mM de diclorhidrato de O-dianisidina. Después de mezclarla, la mezcla de ensayo se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos, y se determinó la actividad enzimática de MPO espectrofotométricamente a 550 nanómetros. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

Ejemplo 1.

Estudios de secreción de los mediadores de la inflamación

Se utilizaron cuatro tipos diferentes de leucocitos o modelos que segregan contenidos específicos de gránulos en respuesta a la activación de PKC inducida por éster de forbol. Los neutrófilos se aislaron de sangre humana y se evaluó la liberación in vitro de MPO por estas células. También se evaluó la liberación mediadores de la inflamación unidos a la membrana a partir de líneas celulares de leucocitos humanos comercialmente disponibles. Se utilizó el clon 15 de la línea celular promielocítica humana HL-60 para evaluar la secreción de EPO (Fischkoff SA. Graded increase in probability of eosinophilic differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells induced by culture under alkaline conditions. Leuk Res 1988; 12:679-686; Rosenberg HF, Ackerman S J, Tenen DG. Humaneosinophil cationic protein: molecular cloning of a cytotoxin and helminthotoxin with ribonuclease activity. J Exp Med 1989; 170:163-176; Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. J Leukoc Biol 1995; 58:49-54; Badewa AP, Hudson CE, Heiman AS. Regulatory effects of eotaxin, eotaxin-2, and eotaxin-3 on eosinophil degranulation and superoxide anion generation. Exp Biol Med 2002; 227:645-651). La línea celular de leucemia monocítica U937 se utilizó para evaluar la secreción de lisozima (Hoff T, Spencker T, Emmendoerffer A., Goppelt-Strube M. Effects of glucocorticoids on the TPA-induced monocytic differentiation. J Leukoc Biol 1992; 52:173-182; Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calciumindependent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. J Immunol 2003; 170:5276-5280; Sundstrom C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). Int J Cancer 1976; 17:565-577). Se utilizó la línea de linfocitos células asesinas

naturales NK-92 para evaluar la liberación de granzima (Gong JH., Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 1994; 8:652-658; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 2001; 10:369-383; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J Immunol Methods* 1987; 104:183-190). En todos los casos, las células se incubaron previamente con un rango de concentraciones de un péptido sintético idéntico a los 24 aminoácidos de N-terminal de MARCKS (péptido de la secuencia N-terminal de MANS miristoilada MA-GAQFSKTAAKGEEAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1) en donde MA está unido con miristoilo a la amina N-terminal del péptido por un enlace amida), o un péptido de control del cambio de sentido (RNS: secuencia aleatoria de péptidos N-terminal; MA-GTAPAAEGAGAEVKR ASAEAKQAF, SEC ID NO: 232) que consiste en los mismos 24 aminoácidos, pero dispuestos en una secuencia de orden aleatorio que posee menos de 13% de identidad de secuencia con la secuencia de péptido de MANS. Alternativamente, las células fueron tratadas previamente con uno de los péptidos truncados sintéticos enumerados en la Tabla 3 a continuación.

Para cada uno de los tipos de células, MANS, pero no RNS, atenúa la liberación de mediadores de la inflamación de una manera dependiente de la concentración. Un período de tiempo de observación conveniente es de 0,5 a 3,0 horas. Los resultados son consistentes con la región N-terminal de la proteína MARCKS implicada en las rutas intracelulares que conducen a la desgranulación de leucocitos.

Aislamiento de neutrófilos humanos - Estos estudios fueron aprobados por el Institutional Review Board (IRB) de estudios humanos. Se aislaron los neutrófilos humanos como se ha descrito previamente (véase Takashi S, Okubo Y, Horie S. Contribution of CD54 to human eosinophil and neutrophil superoxide production. *J Appl Physiol* 2001; 91:613-622) con ligeras modificaciones. En resumen, se obtuvo sangre venosa heparinizada de voluntarios sanos normales, se diluyó con RPMI-1640 (Cellgro; Mediatech, Inc., Herndon, VA) a una proporción de 1:1, en capas sobre un Histopaque (densidad, 1.077g/ml; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) y se centrifugó a 400 g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante y las células mononucleares de la interfase se retiraron cuidadosamente, y se lisaron los eritrocitos del sedimento fueron en agua destilada fría. Los granulocitos aislados se lavaron dos veces con una disolución de sales equilibradas de Hanks (HBSS) y se volvieron a suspender en HBSS sobre hielo. Los neutrófilos utilizados para los experimentos fueron de una pureza >98% con una contaminación por eosinófilos <2%, y la viabilidad fue del >99%, determinada por exclusión en el colorante azul de Tripiano.

Medición de la actividad de MPO liberado por neutrófilos - Para la medición de la liberación de MPO, los neutrófilos humanos purificados en suspensión en HBSS se separaron en alícuotas de 4×10^6 células/ml en tubos de 15 ml y se incubaron previamente ya sea con 50 o 100 μ M de MANS, RNS, o uno de los péptidos de invención durante 10 min a 37°C. A continuación las células se estimularon con 100 nM de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) durante un máximo de 3 horas. Se estableció una referencia de control (referencia de control PMA) utilizando neutrófilos humanos purificados suspendidos en HBSS separados en alícuotas de 4×10^6 células/ml en tubos de 15 ml y se estimularon con 100 nM de 12-miristato 13-acetato de forbol (PMA) en ausencia de péptido de ensayo durante los mismos periodos de tiempo. La reacción se terminó por medio de la colocación de los tubos en hielo y centrifugación a 400g durante 5 min a 4°C.

Se analizó la actividad de MPO en el sobrenadante celular utilizando tetrametilbencidina (TMB) en base a una técnica establecida anteriormente (Abdel-Latif D, Steward M, Macdonald DL, Francis GA., Dinauer MC, Lacy P. Rac2 is critical for neutrophil primary granule exocytosis. *Blood* 2004; 104:832-839). En resumen, se añadieron 100 μ l de disolución de sustrato TMB a 50 μ L de sobrenadantes de células o de MPO estándar humana (EMD Biosciences, Inc., San Diego, CA) en una microplaca de 96 pocillos seguido de incubación a temperatura ambiente durante 15 min. La reacción se terminó por adición de 50 μ L de H₂SO₄ 1M y la absorbancia se leyó a 450 nm en un lector espectrofotométrico de microplacas (VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Estudios de los cultivos de leucocitos.

Hay tres tipos de líneas celulares de leucocitos humanos, específicamente el clon 15 de la línea celular promielocítica HL-60, la línea celular monocítica U937, y la línea de linfocitos de células asesinas naturales NK-92 fueron adquiridas del American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD). El clon 15 de las células HL-60 (ATCC CRL-1964) se mantuvieron en un medio que consiste en un medio RPMI 1640 con L-glutamina suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (Gibco; Invitrogen Co., Carlsbad, CA), 50 UI/ml de penicilina, 50 μ g/ml de estreptomycin, y 25 mM de amortiguador HEPES, pH 7,8, a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. Se inició la diferenciación final a un fenotipo de eosinófilos cultivando las células 5×10^5 células /ml en el medio anterior que contiene 0.5 mM de ácido butírico (Sigma-Aldrich Co.) durante 5 días como se ha descrito previamente (Tiffany HL, Li F, Rosenberg HF. Hyperglycosylation of eosinophil ribonucleases in a promyelocytic leukemia cell line and in differentiated peripheral blood progenitor cells. *J Leukoc Biol* 1995; 58:49-54; Tiffany HL, Alkhatib G, Combadiere C, Berger EA, Murphy PM. CC chemokine receptors 1 and 3 are differentially regulated by IL-5 during maturation of eosinophilic HL-60 cells. *J Immunol* 1998; 160:1385-1392). Las células U937 (ATCC CRL-1593.2) se cultivaron a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ en un medio completo que consiste en RPMI 1640 con L-glutamina suplementado con 10% de FBS, 50 UI/ml de penicilina, y 50 μ g/ml de estreptomycin. Las células NK-92 (ATCC CRL-2407) se mantuvieron en un medio alfa-MEM (Sigma-Aldrich Co.) suplementado con 20% de FBS, 100 U/ml de interleucina-2 (IL-2) (Chemicon Internacional, Inc., Temecula, CA), 5×10^5 M de 2-

mercaptoetanol, 50 IU/mL de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomina a 37°C en una atmósfera que contiene 5% de CO₂. La morfología celular fue clasificada evaluando las células teñidas con Wright-Giemsa. La viabilidad de las células recolectadas en los experimentos se evaluó mediante exclusión con azul de Tripiano y se utilizaron las poblaciones de células con la viabilidad >95%.

5 *Incubación de las células para los ensayos de desgranulación.*

El clon 15 de las células HL-60, U937, y NK-92 se lavaron y se volvieron a suspender 2,5 x 10⁶ células/ml en fenol RPMI 1640 sin rojo (Cellgro; Mediatech, Inc) para todos los ensayos de desgranulación. Las alícuotas de células en tubos de 15 ml se incubaron previamente con las concentraciones indicadas de MANS, RNS, o de un péptido prueba durante 10 min a 37°C. Las células se estimularon entonces con PMA durante un máximo de 2 horas. Se estableció una referencia de control (referencia de control de PMA) para cada tipo de célula utilizando el clon 15 de HL-60, U937, y células NK-92, respectivamente, que se lavaron y se volvieron a suspender 2,5 x 10⁶ células/ml en fenol RPMI-1640 sin rojo y se estimularon con PMA, pero en ausencia de MANS, RNS, o de péptido de prueba durante los mismos períodos de tiempo. La reacción se terminó mediante la colocación de los tubos en hielo y centrifugación de las células a 400 g durante 5 min a 4°C

Para medir la liberación de MPO por los neutrófilos y la lisozima liberada por las células U937, ha sido posible cuantificar la secreción mediante el uso de estándares como MPO humana y ovoalbúmina de clara de huevo, respectivamente. Para la EPO liberada por el clon 15 de las células HL-60 y para la granzima liberada por las células NK-92, no se disponía de estándares para utilizar en la cuantificación. Por lo tanto, se midieron los niveles de EPO y de granzima liberados e intracelulares (a partir de células lisadas) y la EPO y granzima liberadas se expresaron como porcentaje del total (intracelular y liberados) para cada una. Para medir la EPO intracelular en el clon 15 de las células HL-60 y la granzima intracelular en las células NK-92, se tomaron alícuotas adecuadas de células lisadas con 0,1% de Triton X 100 para la cuantificación de proteínas de los gránulos intracelulares tal como se describe a continuación. Todos los tratamientos se expresan como porcentaje del control para minimizar la variabilidad entre los cultivos.

25 *Medición de la liberación de EPO por HL-60*

La actividad de la EPO liberada por el clon 15 de las células HL-60 se ensayó usando TMB de acuerdo con una técnica establecida previamente (Lacy P, Mahmudi-Azer S, Bablitz B, Hagen SC, Velazquez JR, Man SF, Moqbel R. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon-gamma in human eosinophils. Blood 1999; 94:23-32. Por lo tanto, se añadió 100 µl de disolución de sustrato TMB a 50 µL (µL = microlitros) de muestra en una microplaca de 96 pocillos y se incubó a temperatura ambiente durante 15 min (min = minuto). La reacción se terminó por adición de 50 µL de H₂SO₄ 1,0 M y se leyó la absorbancia a 450 nm (nm = nanómetros) en un lector de microplacas espectrofotométrico. La cantidad de EPO secretada se expresó como porcentaje del contenido total, usando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton-X-100.

Medición de la secreción de lisozima por los monocitos.

La lisozima secretada por las células U937 se midió usando un ensayo espectrofotométrico tal como se describe previamente (Balboa M A, Saez Y, Balsinde J. Calcium-independent phospholipase A2 is required for lysozyme secretion in U937 promonocytes. J Immunol 2003; 170:5276-5280) con una ligera modificación. Por lo tanto, se mezclaron 100 µL de la muestra con 100 µL de una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma-Aldrich Co.) (0,3 mg/ml en amortiguador de fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0) en una microplaca de 96 pocillos. Se midió la disminución en la absorbancia a 450 nm a temperatura ambiente. Se construyó una curva de calibración utilizando la lisozima de huevo blanco de gallina (EMD Biosciences, Inc.) como estándar.

Medición de la secreción de la granzima por las células NK.

La granzima secretada por las células NK-92 se sometió a análisis por medición de la hidrólisis de tiobenzil éster de N-α-benciloxycarbonil-L-lisina (BLT) esencialmente como se describe anteriormente (Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. J Immunol Methods 1987; 104:183-190). En resumen, se transfirieron 50 µL de sobrenadante a una placa de 96 pocillos, y se añadieron al sobrenadante 150µL de disolución de BLT (0,2 mM de BLT; EMD Biosciences, Inc., y 0,22 mM de DTNB, Sigma-Aldrich Co.) (mM = milimolar) en disolución salina amortiguada con fosfato (PBS, pH 7,2). Se leyó la absorbancia a 410 nm después de incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como porcentaje del contenido de enzima celular total, usando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton-X-100.

El análisis estadístico.

La significación estadística de las diferencias entre los diversos grupos de tratamiento se evaluó con ANOVA de una vía. Los valores de p<0,05 se tomaron como significativos.

Inhibición de la liberación de MPO por los neutrófilos humanos.

Se encontró que 100 nM de PMA (como estimulador de la liberación de mediadores de la inflamación) incrementaban la liberación de MPO por los neutrófilos humanos en aproximadamente tres veces en comparación con el nivel del control a los 30 min en la referencia de control de PMA, aumentando la liberación de MPO aproximadamente de 5-6 veces a las 3 horas. A los 30 minutos, en relación con la actividad de MPO control como 100% en ausencia PMA y en ausencia de PMA mas MANS, RNS, o péptido de ensayo, la actividad de MPO de la referencia de control de PMA era aproximadamente del 275%, PMA más 50 μM de MANS era aproximadamente del 275 %, y 100 μM de MANS era aproximadamente del 305%. Por lo tanto, no se detectó ningún efecto del péptido de MANS a los 30 min. Sin embargo, durante 1 h, la mayor concentración de MANS (100 μM) tuvo un efecto inhibitor significativo (con un valor aproximado del 260% con respecto al control) o una reducción aproximadamente del 25% en la liberación de MPO en comparación con el nivel de referencia de control de PMA (con un valor aproximado del 340% con respecto al control). La muestra de 50 μM de MANS tenía un valor aproximado de 290% del control o una reducción aproximada del 15% con respecto a la referencia de control de PMA. Durante 2 horas y permaneciendo durante 3 horas, el péptido de MANS atenuó significativamente la actividad de MPO en una manera dependiente de la concentración. A las 2 horas, la actividad de MPO de la referencia de control de PMA era aproximadamente del 540% del control, 50 μM de MANS (con un valor aproximado del 375% con respecto al control) causaron una reducción aproximada del 30% en la liberación de MPO en comparación con la referencia de control de PMA; y 100 μM de MANS (con un valor aproximado del 295% con respecto al control) causaron una reducción aproximada del 45% en la liberación de MPO en comparación con la referencia de control de PMA. A las 3 horas, la actividad de MPO de la referencia de control de PMA fue aproximadamente del 560% del control, 50 μM de MANS (con un valor aproximado del 260% con respecto al control) provocaron una reducción aproximadamente del 33% en la liberación de MPO en comparación con la referencia de control de PMA; 100 μM de MANS (con un valor aproximado del 320% con respecto al control) provocaron una reducción aproximadamente del 40% en la liberación de MPO en comparación con la referencia de control de PMA. El péptido RNS no afectó a la liberación de MPO inducida por PMA en ninguno de los momentos o concentraciones ensayados. Los datos que se presentan en la tabla a continuación representan una concentración de péptidos de ensayo de 100 μM y una incubación de dos horas con 100 nM de PMA.

La inhibición de la liberación de EPO por las células HL-60

La actividad de la EPO en el sobrenadante del clon 15 de las células HL-60 fue significativamente mayor después de 1 y 2 horas de estimulación con PMA. A la hora, en relación con la actividad de EPO del control como 100%, la referencia de control de PMA tenía un valor aproximado de 110%; la muestra que contiene 10 μM de MANS tenía un valor aproximado de 95% produciendo una reducción aproximadamente del 15% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; la muestra que contiene 50 μM de MANS tenía un valor aproximado del 78% produciendo una reducción aproximadamente del 30% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene 100 μM de MANS tenía un valor aproximado del 65% para producir una reducción aproximadamente del 40% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA. A las 2 horas, en relación con la actividad de EPO del control como 100%, la referencia de control de PMA tenía un valor aproximado de 145%; la muestra que contiene 10 μM de MANS tenía un valor aproximadamente del 130% produciendo una reducción aproximadamente del 10% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; la muestra que contiene 50 μM de MANS tenía un valor aproximadamente del 70% produciendo una reducción aproximadamente del 50% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene 100 μM de MANS tenía un valor aproximado del 72% produciendo una reducción aproximadamente del 50% en la actividad de EPO en relación con la referencia de control de PMA. Por lo tanto, tanto en 1 como en 2 horas, MANS a 50 o 100 μM atenuó significativamente la liberación de EPO. El péptido RNS no afectó liberación de EPO incrementada por PMA en ninguno de los momentos o las concentraciones ensayadas. Los datos que se presentan en la tabla a continuación representan una concentración de péptidos de ensayo de 50 μM y una incubación de dos horas con 100 nM PMA.

La inhibición de la liberación de lisozima por las células U937

La secreción de lisozima por células U937 se incrementó por estimulación PMA durante 1 hora después de la incubación, y aumentó aún más a las 2 horas. A la hora, en relación con la secreción de lisozima por las células U937 del control como 100%, la referencia de control de PMA tenía un valor aproximadamente del 210%; la muestra que contiene 10 μM de MANS tenía un valor aproximadamente del 170% produciendo una reducción aproximadamente del 20% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA; la muestra que contiene 50 μM de MANS tenía un valor aproximado del 170% produciendo una reducción aproximadamente del 20% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene 100 μM de MANS tenía un valor aproximado de 115% produciendo una reducción aproximadamente del 45% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA. A las 2 horas, en relación con la secreción de lisozima por células U937 del control como 100%, la referencia de control de PMA tenía un valor aproximadamente del 240%; la muestra que contiene 10 μM de MANS tenía un valor aproximadamente del 195% produciendo una reducción aproximadamente del 20% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA; la muestra que contiene 50 μM MANS tenía un valor aproximadamente del 85% produciendo una reducción aproximadamente del 25% en la secreción de lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA; y la muestra que contiene 100 μM MANS tenía un valor aproximadamente del 140% produciendo una reducción aproximadamente del 40% en la secreción de

lisozima por las células U937 en relación a la referencia de control de PMA. Por lo tanto, la secreción de lisozima se atenuó significativamente tanto 1 como 2 horas después de la estimulación con 100 μ M de MANS, pero no tanto con 50 o 10 μ M de MANS. El péptido RNS no afectó a la secreción de lisozima incrementada por PMA en ninguno de los momentos o concentraciones ensayadas. Los datos que se presentan en la tabla a continuación representan una concentración de péptidos de ensayo de 50 μ M y una incubación de dos horas con 100 nM PMA.

La inhibición de la liberación de granzima por las NK-92 células

Se utilizó la línea de linfocitos de células asesinas naturales NK-92 para evaluar la liberación de granzima (Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. *Leukemia* 8:652-658, 1994; Maki G, Klingemann HG, Martinson JA, Tam YK. Factors regulating the cytotoxic activity of the human natural killer cell line, NK-92. *J. Hematother. Stem Cell Res.*, 10:369-383, 2001; Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J. Immunol. Methods* 104:183-190, 1987).

La medición de la secreción de la granzima por las células NK: se sometió a ensayo la granzima secretada por las células NK-92 por medio de medición de la hidrólisis de tiobencil éster de N α -benciloxycarbonil-L-lisina (BLT, EMD Bioscience, Inc.) esencialmente como se describe anteriormente (Takayama H, Trenn G, Sitkovsky MV. A novel cytotoxic T lymphocyte activation assay. *J. Immunol. Methods* 104:183-190, 1987). Se transfirió una parte alícuota de 50 μ L de sobrenadante a una placa de 96 pocillos, y se añadieron 150 μ l de disolución 0,2 mM de BLT y 0,22 mM de DTNB (Sigma-Aldrich Co.) en disolución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) al sobrenadante. Se midió la absorbancia a 410 nm después de incubación durante 30 min a temperatura ambiente. Los resultados se expresaron como porcentaje del contenido de enzima celular total, usando la cantidad obtenida en el mismo número de células lisadas con Triton-X-100.

Ya que no había granzima estándar de células NK-92 disponible para usar en la cuantificación, se midieron los niveles de granzima tanto liberados como intracelulares (a partir de células lisadas), y la granzima liberada se expresó como un porcentaje del total (intracelular y liberada) para cada uno. Para medir la granzima intracelular de células NK-92, se tomaron en consideración partes alícuotas de células lisadas-X-100 0,1% por Triton adecuadas para la cuantificación de la enzima como se describió anteriormente. Todos los datos se expresan como porcentaje del control para minimizar la variabilidad entre los cultivos. Los datos que se presentan en la tabla a continuación representan una concentración de péptidos de ensayo 50 μ M y una incubación de dos horas con 100 nM PMA.

Citotoxicidad

Debido al estándar ninguno de los tratamientos generó una respuesta tóxica en las células, según la evaluación de retención/liberación de LDH (datos no mostrados) (véase también Park J-A, He F, Martin LD, Li Y, Adler KB. Human neutrophil elastase induces hypersecretion of mucin from human bronchial epithelial cells in vitro via a PKC δ - mediated mechanism. *Am J Pathol* 2005; 167:651-661).

En experimentos preliminares, los siguientes péptidos que se presentan en la tabla a continuación demuestran el porcentaje de inhibición de liberación de MPO por neutrófilos humanos, de la EPO por el clon 15 de las células HL-60, de lisozima por las células U937, y de granzima por las células NK -92 respectivamente, en donde MA- significa la presencia de un grupo sustituyente miristoilo en la posición alfa-N-terminal del péptido; Ac-significa la presencia de un grupo sustituyente acetilo en la posición alfa-N-terminal del péptido; H significa que no hay ningún grupo unido al péptido; y NH₂ significa la presencia de una amida en la posición C-terminal. Los datos de inhibición se promedian a partir de múltiples experimentos. Se muestra en mg/ml la solubilidad cualitativa de los péptidos en una disolución salina 0,5 N a pH 6,5 en la Tabla 3 a continuación. El cambio del resto químico N-terminal de un grupo miristoilo puede conducir a cambios en la solubilidad en medios acuosos de los péptidos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, en la Tabla 3 se muestra que el cambio del grupo miristoil por un grupo acetilo da como resultado el aumento en la solubilidad en agua.

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición para los péptidos representativos y péptidos sustituidos

SEC ID NO.:	N ⁻¹	Secuencia de aminoácidos	C ⁻²	% Inhibición				Mg/mL
				EPO	Llisozima	MPO	Granzima	
219	Ac	AKGE		87,6	7,2			>200
45	Ac	AKGEAAAERPGEAAVA		72,3	34,3			
37	Ac	GAQFSKTAAKGEAAAEE		56,6	8,4			
239	Ac	GAQFSKTAAGE		55,8	37,2			>50
248	Ac	GAQFSKTAAA		55,2	28,3			>100
91	Ac	AAAERPGEAAVA		51,2	29,5			
11	Ac	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE		48,8	0			
79	Ac	GAQFSKTAAKGE		46,7	43,3			>100
153	Ac	RPGEAAVA		45,8	0			
219	Ac	AKGE	NH ₂	45,6	26,8			>200
93	Ac	AQFSKTAAKGE	NH ₂	42,8	51,8			>90
141	Ac	SKTAAKGE	NH ₂	42,2	0			>200
241	Ac	GAQFSKTAAKGA		40,9	24,1			>50
143	Ac	TAAKGEAA		40,4	0,5			>230
251	Ac	AAGE		39,1	36,9			>200
106	Ac	GAQFSKTAAK		35,7	41,2	25,3		>100
249	Ac	GAQFSATAAA		35,7	3,2			<10
1	Ac	GAQFSKTAAKGEAAAERPGE AAVA		33,7	39,8			>250
121	Ac	GAQFSKTAA		33,3	28,9			>20
106	Ac	GAQFSKTAAK (all d)		26,9	8,9	40		>100
124	Ac	FSKTAAKGE	NH ₂	25,3	56,7			>100
79	Ac	GAQFSKTAAKGE	NH ₂	24,7	38,6	26,5		>60
108	Ac	QFSKTAAKGE	NH ₂	15,7	60,7			>150
179	Ac	AAKGEA		10,6	9,2			>150

(continuación)

Tabla 3. Resultados de las solubilidades de los ensayos de inhibición para los péptidos representativos y péptidos sustituidos									
SEC ID NO.:	N- ¹	Secuencia de aminoácidos	C- ²	% Inhibición			Mg/mL		
				EPO	Llisozima	MPO		Granzima	Solubilidad ³
159	Ac	KTAAKGE	NH ₂	0	24,3		>200		
137	Ac	GAQFSKTA		0	0		>200		
79	H	GAQFSKTAAKGE				27,9	>60		
1	MA	GAQFSKTAAKGEEAAERPGE AAVA		46,1	40,8	31,2	<5,0		
106	MA	GAQFSKTAAK		37,4	56,6		>10		
11	MA	GAQFSKTAAKGEEAAERPGE		33,6	99				
179	MA	AAKGEA		31,4	28,6		<1,0		
37	MA	GAQFSKTAAKGEEAAE		30,3	99		>2,0		
79	MA	GAQFSKTAAKGE		25,2	85,2	43,2	>2,0		
91	MA	AAERPGEAAVA		21,6	98		<20		
45	MA	AKGEEAAERPGEAAVA		18,1	98		>80		
153	MA	RPGEAAVA		0	99				
15	MA	SKTAAKGEAAERPGEAAVA		0	99		>80		
143	MA	TAAKGEAA		0	80,2		<1,0		
219	MA	AKGE		0	28,6		<1,0		
232	MA	GTAPAAEGAGAEVKRASAEA KQAF		0	0	0	>15		
234	MA	GAQFSKTKAKGE				65,2	>3,0		

¹ N- = Grupo N-terminal

² C- = Grupo C-terminal

³ 0,5 N Suero Salino, pH 6,5

Ejemplo 2

Inhibición in vivo de la inflamación del pulmón inducida por lipopolisacárido (LPS) por MANS y péptidos relacionados

Este ejemplo se realizó esencialmente según los métodos descritos por Cox, G, Crossley, J., y Xing, Z.; Macrophage engulfment of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation in vivo; Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 12:232-237, 1995; Hirano S., Quantitative time-course profiles of bronchoalveolar lavage cells following intratracheal instillation of lipopolysaccharide in mice, Ind. Health 35:353-358, 1997; and Ulich TR, Watson LR, Yin SM, Guo KZ, Wang P, Thang H, and del Castillo, J. Am. J. Pathol. 138:1485-1496, 1991.

De este modo, se obtuvieron ratones hembra CD1 de seis a siete semanas de edad con un peso de 15-20 gramos de los laboratorios Charles River y se alojaron en grupos de 5 ratones por jaula. Los animales recibieron la dieta estándar para roedores y agua filtrada ad libitum. Los animales se alojaron según las directrices prescritas por NIH a temperatura estándar (64° a 79° F) y humedad relativa de 30 a 70%.

Cinco grupos de tratamiento de ratones, con 5 animales en cada grupo, se trataron ya sea con PBS seguido por PBS, con PBS seguido por LPS, con el péptido de MANS (miristoilado) seguido por LPS, con el péptido acetilado de SEC ID NO: 1, seguido por LPS, o con el péptido acetilado de SEC ID NO: 106, seguido por LPS.

Pre-tratamiento por instilación intranasal del péptido: Para evaluar in vivo la capacidad de un péptido de la invención para inhibir o reducir la inflamación de pulmón inducida por LPS se disolvió en PBS a una concentración de 1 mM. Los animales, anestesiados con 0,8% de isoflurano por inhalación, se trataron previamente con 2x 10 µM con un bolo intranasal de disolución de péptido en una fosa nasal 30 minutos antes de la instilación posterior con LPS.

Instilación intranasal con LPS: La endotoxina lipopolisacárida (LPS) (endotoxina derivada de Escherichia coli Serotipo 011: B4; Sigma, St Louis, MO, véase ficha técnica del producto Sigma L4130 titulada Lipopolysaccharides from Escherichia coli 011:B4) se disolvió en una disolución salina de amortiguador fosfato (PBS) 2500 µM g/ml. Para exponer a los animales a la endotoxina, un 10 µL de bolo intranasal de 2500 µM g/ml de una disolución de endotoxina se administró a los animales que habían sido anestesiados con 0,8% de isoflurano por inhalación. El bolo de 10 µL se aplicó en una fosa nasal. Se controló la dificultad respiratoria, el letargo y la disminución de la ingesta de agua/comida de los animales tras las instilaciones de endotoxinas.

Lavado bronco alveolar (BAL): Seis horas después de la última instilación, los animales fueron anestesiados (90 mg/kg de Nembutal) y se sacrificaron por desangrado. Se lavaron los pulmones 2 veces con alícuotas de 1,0 ml de PBS. El líquido recogido del BAL se centrifugó para eliminar las células para su posterior recuento y análisis diferencial. El líquido de lavado recuperado se utilizó para el análisis de las proteínas totales, mieloperoxidasa (MPO), LDH, y hemoglobina.

Análisis: Las alícuotas del líquido del BAL se utilizaron inmediatamente para la valoración de los niveles de LDH, proteínas totales, o hemoglobina utilizando el analizador Fara de COBAS (FARA COBAS II analizador automatizado, Roche Diagnostic Systems Inc., Montclair, NJ). Una parte alícuota de líquido del BAL se congeló a -80°C para la cuantificación posterior de la mieloperoxidasa (MPO) con un ensayo ELISA específico de ratón (Cell Sciences, Inc., Canton, Massachusetts). Los datos del BAL se analizaron por técnicas estándar para examinar las diferencias entre los grupos control y de tratamiento. En las tablas siguientes se proporcionan los resultados que demuestran la inhibición o reducción de la inflamación por el péptido de prueba.

Tabla 4. Valores promedio de los marcadores de inflamación en presencia del péptido de MANS, MAGAQFSKTAAKGEEAAERPGEEAAVA, SEC ID NO.:1

Régimen de tratamiento	Recuento total de células	Recuento total de neutrófilos	% de neutrófilos del total de células	MPO (ng/mL)	Proteína Total (µg/ml)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dl)
PBS / PBS n=5	157,020	29317	18,7	3,28	125,60	68,20	0,00
PBS/LPS n=5	264,200	110,061	41,7	28,98	272,40	60,40	0,19
MANS / LPS n=7	208,457	64,481	30,9	9,49	175,00	68,57	0,05

Tabla 5, Valores promedio de los marcadores de la inflamación en presencia de un análogo de MANS N-terminal acetilado, Ac-GAQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA, SEC ID NO: 1

Régimen de tratamiento	Recuento total de células	Recuento total de neutrófilos	Porcentaje de neutrófilos del total de células	MPO (ng/mL)	Proteína Total (µg/ml)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dl)
PBS / PBS n=5	89,440	19,770	22,1	5,45	230,6	84,0	0,00
PBS/LPS n=5	251,360	64,578	65,5	37,90	153,4	89,9	0,01
Ac-SEC ID NO,:1/ LPS n=5	254,400	105,499	41,47	30,79	182,75	74,5	0,01

Tabla 6, Valores promedio de los marcadores de la inflamación en presencia del péptido Ac-GAQFSKTAAG acetilado, SEC ID NO,:106

Régimen de tratamiento	Recuento total de células	Recuento total de neutrófilos	Porcentaje de neutrófilos del total de células	MPO (ng/mL)	Proteína Total (µg/ml)	LDH (unidades/L)	Hb (g/dl)
PBS / PBS n=5	312,620	66,521	21,3	4,88	113,8	61,80	0,00
PBS/LPS n=5	327,680	80,077	24,4	7,19	116,4	78,20	0,00
Ac-SEC ID NO,:106/ LPS n=5	305,688	9,170	3,0	1,50	131,0	106,86	0,00

5 Tabla 7. Inhibición de los marcadores de inflamación por el péptido de MANS (Mir-SEC ID NO:1), péptidos prueba (Ac- GAQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA), SEC ID NO: 1, y Ac-GAQFSKTAAG, SEC ID NO: 106, en relación con el tratamiento PBS/LPS:

Régimen de Tratamiento	Inhibición de la migración de neutrófilos	Inhibición de MPO
MANS / LPS	41,4 %	67,2%
SEC ID NO: 1 / LPS	35,9 %	18,75%
Ac-SEC ID NO, 106 / LPS	88,5%	79,1%

10 PB /PBS indica que se administró sólo el control de PBS, y no se añadió ninguna endotoxina LPS para estimular la migración quimiotáctica de los neutrófilos; PBS/LPS indica que se añadió LPS (endotoxina) para estimular la migración quimiotáctica de los neutrófilos; MANS/LPS indica el tratamiento previo con el péptido de MANS en PBS seguido de estimulación con LPS para inducir la migración de los neutrófilos. El porcentaje de neutrófilos en el recuento total de células en los grupos de tratamiento con LPS se redujo de 41,7% a 30,9% por el tratamiento con el péptido de MANS; de 65,5% a 41,47% por el tratamiento con el péptido Ac-G AQFSKTAAGGAAAERPGEAAVA, SEC ID NO. 1; de 24,4% a 3,0% por el tratamiento con el péptido Ac-GAQFSKTAAG, SEC ID NO. 106. Los niveles de MPO medidos en los grupos de tratamiento con LPS se redujo de 28,98 ng/ml a 9,49 ng/ml por el tratamiento con el péptido de MANS; de 37,9 ng/ml a 30,79 ng/ml por el tratamiento con el péptido acetilado de la SEC ID NO: 1 y de 7,19 ng/ml a 1,50 ng/ml por el tratamiento con el péptido acetilado de la SEC ID NO: 106.

Ejemplo 3

Modelo de ratón de la EPOC inducida por ozono

20 El estrés oxidativo por irritantes químicos tales como el ozono es una característica ampliamente reconocido de la enfermedad respiratoria obstructiva crónica (EPOC). Véase: Repine JE, Bast A, Lankhorst I, and the Oxidative Stress Study Group, Am. J. Respir. Crit. Care Med. 156:341-357, 1997; and also Harkema JR and Hotchkiss JA, Toxicology Letters, 68:251-263, 1993.

25 Se obtuvieron ratones hembras Balb/C de diez semanas de edad de los laboratorios Charles River y se alojaron según las directrices del NIH en grupos de 5 por jaula. Los animales recibieron la dieta estándar para roedores y agua filtrada ad libitum. Tres grupos de tratamiento de ratones, 5 animales en cada grupo, se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (20 mg/kg) y fueron después pretratados por administración intratraqueal de 25 µM de ya sea PBS solo, o una disolución de 1,0 mM de péptido de MANS en

PBS, o una disolución de 1,0 mM de un acetilado fragmento de péptido de MANS- Ac-GAQFSKTAAK acetilado designado como SEC ID NO: 106 en PBS. Después de 30 minutos, los animales se colocaron entonces una cámara hecha a medida apropiada para exposición al ozono o aire forzado. Los animales fueron expuestos al ozono durante 2 horas (a concentraciones de ozono de 1-10 ppm por un método ligeramente modificado al descrito por Haddad et al., 1995. (Haddad E-B, Salmon M, Sun J, Liu S, Das A, Adcock I, Barnes PJ, y Chung KF, FEBS Letters, 363:285-288, 1995). El ozono se generó usando un aparato generador de ozono modelo OL80F/B de OzoneLab, Burton, Columbia Británica, Canadá. La concentración de ozono se monitorizó continuamente mediante un Analizador fotométrico Teledyne 03 (modelo 400E, Teledyne Instruments, City of Industry, CA). Otros dos grupos de ratones, cada uno sin ningún tratamiento previo, se expusieron al ozono en las mismas condiciones, o se expusieron a aire forzado, en condiciones similares a las del grupo de tratamiento con ozono pero en ausencia de ozono. Después de la exposición, los animales se sacrificaron por desangrado y los pulmones se lavaron 2 veces con alícuotas de 1,0 ml de PBS. El fluido recogido del lavado bronco alveolar (BAL) se centrifugó para eliminar las células para su posterior recuento y análisis diferencial. El fluido de lavado recuperado se utiliza para el análisis adicional de proteína y de la IL-6, IFN γ , y KC (análogo murino de IL-8) por ensayo ELISA (kits de ensayo obtenidos de R & D Systems, Minneapolis, MN).

En la tabla se proporciona el porcentaje de inhibición de la migración de neutrófilos al líquido del BAL como una función de los grupos de tratamiento y en relación a un grupo control tratado con PBS solo.

Tabla 8: Inhibición de la migración de neutrófilos inducida por ozono por el péptido de MANS y por el péptido acetilado SEC ID NO: 106, Ac-GAQFSKTAAK.

Grupo de Tratamiento	% de migración de neutrófilos en el fluido de BAL
MANS + Ozono	93,0
Ac-SEC ID NO:106 + Ozono	81,2
PBS + Ozono	No aplicable
Solo aire forzado	No aplicable

Se obtuvieron las concentraciones de IL-6 en pg/ml en el líquido de BAL, como una función del tratamiento previo con inyección intratraqueal y del tratamiento posterior con ozono, de la siguiente forma. Se encontró que los niveles de IL-6 eran: aproximadamente 364,5 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con el péptido de MANS y expuestos después al ozono; aproximadamente 130,4 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con un fragmento del péptido de MANS, -Ac-GAQFSKTAAK acetilado (SEC ID NO: 106), y luego expuestos al ozono; aproximadamente 1041,3 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con PBS y expuestos al ozono; aproximadamente 43,2 pg/ml en un grupo de ratones expuestos directamente a aire forzado sin ningún tratamiento previo.

Se obtuvieron las concentraciones de KC en pg/ml en el líquido del BAL, como una función del tratamiento previo con inyección intratraqueal y del tratamiento posterior con ozono, de la siguiente forma. Se encontró que los niveles de KC eran: aproximadamente 183,6 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con el péptido de MANS y expuestos después al ozono; aproximadamente 159,7 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con un fragmento del péptido de MANS, -Ac-GAQFSKTAAK acetilado (SEC ID NO: 106), y luego expuestos al ozono; aproximadamente 466,6 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con PBS y expuestos al ozono; aproximadamente 36,3 pg/ml en un grupo de ratones expuestos a aire forzado y sin tratamiento previo.

Se obtuvieron las concentraciones de IFN γ en pg/ml en el líquido del BAL como una función del tratamiento previo con inyección intratraqueal y del tratamiento posterior con ozono de la siguiente forma. Se encontró que los niveles de IFN γ eran: aproximadamente 7,4 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con el péptido de MANS y luego expuestos al ozono; aproximadamente 3,6 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con un fragmento del péptido de MANS, -Ac-GAQFSKTAAK acetilado (SEC ID NO: 106), y luego expuestos al ozono; aproximadamente 8,6 pg/ml en un grupo de ratones pretratados con PBS y expuestos al ozono; y aproximadamente 5,0 pg/ml en un grupo de ratones expuestos a aire forzado.

La administración de ozono a ratones aumentó significativamente el número de células infiltradas de neutrófilos, así como los niveles de IL-6 y KC en el BAL. En comparación con el grupo control en el que los ratones fueron pretratados con PBS, el grupo tratado previamente con el péptido de MANS y el grupo tratado previamente con el péptido acetilado, Ac-GAQFSKTAAK, SEC ID NO: 106 acetilada mostraba cada uno de ellos una reducción de las células infiltradas de neutrófilos el fluido del BAL después de la exposición al ozono (por ejemplo, 93% \pm 10% y 81% \pm 10%, respectivamente, frente al control de PBS). En paralelo, el péptido de MANS y el péptido acetilado de la SEC ID NO: 106 también tenían concentraciones de KC marcadamente disminuidas (por ejemplo, 65,8% \pm 10% y 71,3% \pm 10%, respectivamente, frente al control de PBS) y los niveles IL-6 (por ejemplo, 67,8% \pm 15%, MANS y 91,3% \pm 15% SEC ID NO: 106 acetilada frente al control de PBS) después de la exposición al ozono, pero tuvo poco efecto sobre los niveles de IFN γ . En conjunto, estos datos evidencian que el péptido de MANS y los péptidos acetilados de la SEC ID NO: 106 disminuyen o inhiben marcadamente la migración de neutrófilos inducida por ozono en las vías

respiratorias, así como disminuyen selectivamente quimioquinas y citoquinas. Los niveles de IL-6 en los fluidos del BAL de los animales pretratados con el péptido de MANS o con el péptido de la SEC ID NO: 106 acetilados mostraron una inhibición aproximadamente del 68% y 91%, respectivamente, en comparación con aquellos tratados previamente con PBS. También los niveles de KC en los fluidos de BAL de los animales pretratados con el péptido MANS o con péptido acetilado SEC ID N°: 106 mostraron aproximadamente el 65% y el 71% de inhibición en comparación con aquellos tratados previamente con PBS.

Ejemplo 4

Modelo de bronquitis crónica

El procedimiento se describe en Voynow JA, Fischer BM, Malarkey DE, Burch LH, Wong T, Longphre M, Ho SB, Foster WM, Neutrophil Elastase induces mucus cell metaplasia in mouse lung, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 287:L1293-L1302, 2004 y se sigue para desarrollar un modelo de bronquitis crónica en el ratón. Específicamente, la hiperplasia de las células calciformes, una característica patológica distintiva de la bronquitis crónica, es inducida por exposición crónica de los ratones a la Elastasa de Neutrófilos humana (NE) que se instila en las vías respiratorias.

Los ratones machos Balb/c aspiran intratraquealmente las NE humanas. Se obtiene comercialmente un total de 30 ratones (aproximadamente de 25-30 g de peso) de un proveedor como Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME. Los ratones se mantuvieron en un ciclo diurno de 12 horas, con los alimentos y el agua siempre ad libitum. Los animales reciben NE por aspiración orofaríngea en los días 1, 4 y 7. Inmediatamente después de la anestesia inhalatoria con isoflurano (ISOFLO de Abbott Laboratories y un Sistema de Anestesia por Circuito Abierto de Gas de Stoelting), los animales son suspendidos por sus incisivos superiores en un tablero inclinado 60°, y se administra un volumen líquido de NE humana [50 ug (43,75 unidades)/40 µL de PBS (Elastin Productos, Owensville, MO) con la lengua del animal extendida hacia la parte distal de la orofaringe. Con la lengua extendida, el animal es incapaz de tragar, y el volumen de líquido se aspira por el tracto respiratorio.

A los 7 días después de la última exposición a NE, cuando la hiperplasia de las células calciformes de las vías respiratorias de la bronquitis crónica es máxima (véase Voynow et al, 2004), los ratones (5 animales por grupo) se instilan de forma intratraqueal con 50 µM de PBS (como control), o 100 uM de una disolución de péptido de MANS, una disolución de péptido RNS, o una disolución de un péptido como el péptido acetilado de la SEC ID NO: 106 disuelto en PBS. Quince minutos más tarde, la secreción de moco es provocada por la administración de metacolina, utilizando un sistema nebulizador de Buxco que proporciona un aerosol fino que administra metacolina 60mM aproximadamente durante 3 min. Quince minutos después de la administración de metacolina, los ratones se sacrifican por exposición a 100% de gas CO2 por inhalación.

Histoquímica. Después de las exposiciones descritas anteriormente, los pulmones de los animales se lavan para eliminar de la sangre, y luego se inflan con OCT (Medio de Temperatura de Corte Óptima (Sakura Finetck, Torrance, CA), diluido a la mitad en disolución salina. Los pulmones están sumergidos en formol al 10% en PBS durante la noche a 4°C, y se procesan en cera de parafina. Se tratan las secciones de cinco µM con ácido periódico de Schiff/hematoxilina para teñir las mucinas de las vías respiratorias, por ejemplo como se ha descrito por Singer M, Vargaftig BB, Martin LD, Park JJ, Gruber AD, Li Y, Adler KB, A MARCKS-related peptide blocks mucus hypersecretion in a murine model of asthma., *Nature Medicine* 10:193-196, 2004.

Indicador histológico de mucosidad. Se llevó a cabo un indicador histológico de mucosidad (Whittaker L, Niu N, Temann U-A, Stoddard A, Flavell RA, Ray A, Homer RJ, and Cohn L, Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 27:593-602, 2002) en secciones teñidas con AB/PAS que incluyen vías aéreas centrales y periféricas. Los portaobjetos se examinan con un objetivo de 10 X, y las imágenes se capturan con una cámara digital. Se forma la imagen con un mínimo de cuatro secciones de vías aéreas representativas transversales o sagitales por animal. Sólo son analizados los conductos de aire donde la circunferencia completa de la vía aérea puede ser visualizada e incluida en la imagen. Las vías aéreas que se abren directamente a un espacio alveolar no están incluidas. Se determinara semi- cuantitativamente la extensión con tinción PAS positiva para cada una de las vías respiratorias fotografiada por un examinador que no conoce las condiciones de tratamiento para cada sección, utilizando el siguiente sistema de clasificación de cinco niveles: grado 0, sin tinción PAS; grado 1, el 25% o menos del epitelio de la vía aérea tiene tinción PAS; grado 2, 26-50% del epitelio de la vía aérea tiene tinción PAS; grado 3, 51-75% del epitelio de la vía aérea tiene tinción PAS; y el grado 4, > 75% del epitelio de las vías respiratorias tiene tinción PAS. Este sistema de clasificación se utiliza para calcular un índice de puntuación de moco para cada grupo, y los resultados se presentan como promedio ± SE.

Todos los resultados se presentan como media ± error estándar (n = 5 animales, 10-20 secciones para cada uno). Los niveles de significación se calcularán utilizando ANOVA de una vía seguida por la prueba de Scheffe, utilizando el software SPSS 6.1 (* = significancia entre los datos con un umbral de p <0,05).

Ejemplo 5

Ensayos en vivo

El objetivo de la siguiente serie de experimentos es establecer los efectos de los péptidos de esta invención después de la administración in vivo, ya sea por instilación local en el sitio de la inflamación o por inyección intravenosa, en la inflamación en comparación con los péptidos de control tales como RNS. Dos modelos son útiles para esta determinación: (i) el modelo murino de inflamación de la bolsa de aire y (ii) el modelo murino de peritonitis inducida por tioglicolato. Ambos son modelos bien caracterizados de la inflamación en el que los neutrófilos tienen un papel esencial. El modelo de bolsa de aire permite la determinación de los efectos de los péptidos durante un período de tiempo inflamación corto (aproximadamente 4 horas) y el modelo de peritonitis es útil en relación con periodos de inflamación de tiempo más largos (aproximadamente 24 horas).

Diseño experimental general:

- 10 Cuatro estudios, dos para cada modelo, uno de análisis de la administración de i.v. de los péptidos y otro de análisis de la administración local de los péptidos fueron útiles para estudiar el efecto de los péptidos descritos en esta solicitud. Cada estudio consiste en 2 grupos experimentales, un control no inflamado (tratado con vehículo) y un grupo inflamado (es decir, tratado con un estímulo inflamatorio). Cada grupo se divide en 5 y, opcionalmente 6 subgrupos de tratamiento, n = 6 para cada subgrupo. Los subgrupos de tratamiento son, por ejemplo: vehículo, 15 MANS, RNS, péptido de prueba, opcionalmente un péptido que tiene una secuencia desordenada del péptido de prueba cuya secuencia desordenada se denominó "péptido-SCR", y dexametasona. La dexametasona sirve como un agente anti-inflamatorio de referencia. La selección de las dosis apropiadas para la administración por inyección i.v. o instilación local se determinan a partir de los experimentos preliminares de respuesta a la dosis. Las dosis provisionales en la base a la actividad inhibidora de MANS por neutrófilos humanos son: 1 mg/kg para 20 administración por una vía intravenosa una sola vez o una concentración final de 50 μ M administrada localmente (dentro de la bolsa de aire o i.p.). La dosis para la administración por vía i.v. se elige suponiendo un volumen de distribución de 2 L/kg.

Modelo de inflamación de la bolsa de aire:

- 25 Los ensayos para la infiltración de neutrófilos y la inflamación en la bolsa de aire de ratón se realizaron como se describe en Clish CB, O'Brien JA, Gronert K, Stahl GL, Petasis NA, Serhan CN. Local and systemic delivery of a stable aspirin-triggered lipoxin prevents neutrophil recruitment in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Jul 6; 96 (14):8247-52. Por lo tanto, se anestesian ratones BALB/c blancos macho (6-8 semanas) con isoflurano, y bolsas de aire dorsales se suben mediante la inyección de 3 ml de aire estéril por vía subcutánea en los días 0 y 3. En el día 6 y mientras que los ratones están anestesiados con isoflurano, se administra el vehículo, MANS, RNS, péptido de prueba, u opcionalmente péptido-SCR en forma de una inyección de bolo ya sea i.v. en la vena de la cola en 100 μ L de disolución salina estéril al 0,9% o localmente en la bolsa de aire en 900 μ L de PBS -/- (salina tamponada con fosfato de Dulbecco sin iones de magnesio o calcio, BioWhittaker). La dexametasona (Sigma) por vía i.v. administrada como 0,1 mg/kg en 100 μ L de disolución salina estéril al 0,9% de o localmente como 10 μ g en 900 μ L de PBS -/-, sirve como un agente anti-inflamatorio de referencia. La inflamación de la bolsa de aire se induce por la 35 inyección local del factor α de necrosis tumoral murino recombinante (TNF- α , 20 ng) (Boehringer Mannheim) disuelto en 100 μ L de PBS estéril. Mientras que los ratones están anestesiados con isoflurano, las bolsas de aire se lavan dos veces con 3 ml de PBS estéril 4 horas después de la inyección inicial de TNF- α . Los aspirados se centrifugan a 2000 rpm durante 15 min a 23°C. Los sobrenadantes se eliminan, y las células se suspenden en 500 μ L de PBS. Se analizaron alícuotas del sobrenadante con respecto a las concentraciones de mediadores de la inflamación (opcionalmente excepto para TNF- α), la actividad de MPO, y la peroxidación de lípidos. 40

- Se hizo el recuento total leucocitos de la suspensión de células con un microscopio óptico usando un hemocitómetro. Las células resuspendidas aspiradas (50 μ L) se añaden a 150 μ L BSA al 30% y se centrifugan en el portaobjetos del microscopio a 2.200 rpm durante 4 min utilizando una cito centrífuga. Se determinan los recuentos diferenciales de leucocitos por citospin teñidos con tinción Wright Giemsa y se utilizan para calcular el número absoluto de cada uno de los leucocitos por exudado de la bolsa de aire. Para el análisis microscópico, los tejidos se obtienen con un punzón de biopsia de tejidos de 6 mm (Acu-Punch, Acuderm) y se fijan con formaldehído tamponado al 10%. A continuación las muestras se incluyen en parafina, en cortadas y teñidas con hematoxilina-eosina. Se recuentan los neutrófilos de las secciones histológicas contando el número de células/HPF. La dermis distante sirve como un control para la dermis de la bolsa de aire inflamada. 45

- 50 Los datos se presentan como el número total de neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos por exudado o el número de neutrófilos por tejido por campo de alta potencia. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6). La significancia de cualquier tratamiento sobre la migración se determina por ANOVA. P <0,05 se considera significativo.

Ejemplo 6.

- 55 Modelo de Inflamación del Peritoneo:

Se utilizan ratones macho BALB/c (6-8 sem) y se llevan a cabo los modelos de peritonitis inducida por tioglicolato como se describe en Tedder TF, Steeber DA, Pizcueta P. L-selectin-deficient mice have impaired leukocyte recruitment into inflammatory sites. J Exp Med. 1995 Jun 1; 181(6):2259-64. Se administra el vehículo, MANS, RNS,

péptido de prueba, y, opcionalmente, péptido-SCR en forma de una inyección de bolo, ya sea en la vena de la cola en 100 μ L de disolución salina estéril al 0,9% o localmente en el peritoneo 900 μ L de PBS -/- inmediatamente antes de inyección i.p. de tioglicolato. Se administra dexametasona por vía intravenosa como 0,1 mg/kg en 100 μ L de disolución salina estéril al 0,9% o localmente como 10 μ g en 900 μ L de PBS -/-, sirve como un agente anti-inflamatorio de referencia. La inflamación se induce por la inyección de 1 ml de disolución de tioglicolato (3% peso/vol; Sigma Immunochemicals) por vía intraperitoneal en los ratones. Los ratones son sacrificados humanitariamente 24 horas después de la inducción de la inflamación y se inyectan 5 ml de agua tibia (37°C ~ medio (RPMI 1640, 2% de FCS, y 2 mM de EDTA) en el peritoneo seguido de un suave masaje en el abdomen. Se centrifugan los aspirados del líquido de lavado abdominal a 2000 rpm durante 15 min a 23°C. Los sobrenadantes se eliminan, y las células se suspenden en 500 μ L de PBS. Se analizaron alícuotas del sobrenadante para la actividad de MPO, las concentraciones de mediadores de la inflamación y la peroxidación de lípidos.

Se hizo el recuento total leucocitos de la suspensión de células con un microscopio óptico usando un hemocitómetro. Las células resuspendidas aspiradas (50 μ L) se añaden a 150 μ L BSA al 30% y se centrifugan en el portaobjetos del microscopio a 2.200 rpm durante 4 min utilizando una cito centrífuga. Se determinan los recuentos diferenciales de leucocitos por citospin teñidos con tinción Wright Giemsa y se utilizan para calcular el número absoluto de cada uno de los leucocitos por aspirado de la bolsa de aire.

Los datos se presentan como el número total de neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos por exudado o el número de neutrófilos por tejido por campo de alta potencia. Los valores se presentan como la media \pm SEM (n=6). La significancia de cualquier tratamiento sobre la migración se determina por ANOVA. P <0,05 se considera significativo.

Desgranulación:

La mieloperoxidasa se utiliza como un marcador de la desgranulación. La actividad de la mieloperoxidasa en el sobrenadante celular obtenido a partir de la bolsa de aire o líquido de lavado peritoneal se sometió a ensayo y se analizó como se ha descrito anteriormente usando el método de TMB.

Concentraciones de los mediadores de la inflamación:

Las concentraciones de mediadores pro-inflamatorios clave TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6, KC, y PGE2 en la bolsa de aire y el líquido de lavado peritoneal se determinaron utilizando kits comerciales de ELISA (R & D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

La peroxidación lipídica:

La concentración de isoprostanos- F2 es una medida sensible y específica de la lesión oxidativa resultante de la liberación de intermediarios reactivos del oxígeno a partir de neutrófilos y de otras células {Milne GL, Musiek ES, Morrow JD. F2-isoprostanos as markers of oxidative stress in vivo: an overview. Biomarkers. 2005 Nov ;10 Suppl 1:S10-23}. La concentración de isoprostano- F2 se determina en la bolsa de aire y en los sobrenadantes del exudado peritoneal usando una prueba ELISA disponible comercialmente (8-Isoprostane EIA, Cayman Chemical) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Punto final:

El experimento se considera exitoso si la administración local o sistémica del péptido de prueba reduce la inflamación en una o en más de las medidas anteriores de inhibición de la liberación de mediador de la inflamación.

Los fragmentos de péptidos activos de esta invención inhiben la afluencia de neutrófilos y la desgranulación en la bolsa de aire inflamado o en el peritoneo, lo da como resultado la reducción de la actividad de MPO, la reducción de la peroxidación de lípidos, y la reducción de la producción de mediadores de la inflamación.

Los ejemplos anteriores son ilustrativos de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes de la misma.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> BioMarck Pharmaceuticals, Ltd.
- <120> Métodos para atenuar la liberación de mediadores inflamatorios y péptidos útiles en ellos
- <130> BMRK-004/01WO
- 5 <150> US 60/833.239
- <151> 26-07-2006
- <160> 252
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 24
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 15 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 1
- Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15
- Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
20
- 20 <210> 2
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 25 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 2
- Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15
- Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
20
- 30 <210> 3
- <211> 23
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 35 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 3

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

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 4
 <211> 22
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 4

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 20

<210> 5
 <211> 22
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 5

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

Pro Gly Glu Ala Ala Val
 20

<210> 6
 <211> 22
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 6

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

Gly Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 7
 <211> 21
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 7

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu Ala
20

<210> 8

<211> 21

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 8

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

Pro Gly Glu Ala Ala
20

<210> 9

<211> 21

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 9

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

Gly Glu Ala Ala Val
20

<210> 10

<211> 21

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 10

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

Glu Ala Ala Val Ala
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 11

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly Glu
 20

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 12

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

Pro Gly Glu Ala
 20

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 13

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

Gly Glu Ala Ala
 20

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT

ES 2 488 092 T3

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 14

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

Glu Ala Ala Val
 20

<210> 15

<211> 20

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 15

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

Ala Ala Val Ala
 20

<210> 16

<211> 19

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 16

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro Gly

<210> 17

<211> 19

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 17

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

Pro Gly Glu

<210> 18
 <211> 19
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 18

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

Gly Glu Ala

<210> 19
 <211> 19
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 20 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 19

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

Glu Ala Ala

<210> 20
 <211> 19
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 30 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 20

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

Ala Ala Val

<210> 21
 <211> 19
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 21

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

Ala Val Ala

- 5 <210> 22
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 22

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg Pro

- 15 <210> 23
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 23

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

Pro Gly

- 25 <210> 24
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 24

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

Gly Glu

- 35 <210> 25
- <211> 18

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 <400> 25

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

Glu Ala

10 <210> 26
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 <400> 26

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

Ala Ala

20 <210> 27
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 <400> 27

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

Ala Val

30 <210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 <400> 28

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

Val Ala

- <210> 29
- <211> 17
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- 10 <400> 29

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

Arg

- <210> 30
- <211> 17
- <212> PRT
- 15 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- 20 <400> 30

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

Pro

- <210> 31
- <211> 17
- <212> PRT
- 25 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- 30 <400> 31

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

Gly

- <210> 32
- <211> 17
- <212> PRT
- 35 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 32

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

Glu

5 <210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 33

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

Ala

15 <210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 34

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

Ala

25 <210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 35

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

Val

35 <210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 36

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

Ala

<210> 37

<211> 16

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 37

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 38

<211> 16

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 38

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

<210> 39

<211> 16

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 39

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

<210> 40

<211> 16

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 40

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

<210> 41

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 41

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

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 42

25 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10 15

<210> 43

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 43

35 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10 15

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 44

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

<210> 45
 <211> 16
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 45

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

<210> 46
 <211> 15
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 46

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10 15

<210> 47
 <211> 15
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 47

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10 15

<210> 48
 <211> 15
 <212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 48

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

<210> 49
 <211> 15
 <212> PRT

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 53

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10 15

5 <210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 54

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10 15

15 <210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 55

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10 15

25 <210> 56

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 56

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

35 <210> 57

<211> 14

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 57

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 58
 <211> 14
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 58

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 59
 <211> 14
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 59

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 60
 <211> 14
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 60

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

<210> 61
 <211> 14
 <212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 61

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 62
 <211> 14

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 62

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5 10

10 <210> 63
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 63

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

20 <210> 64
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 64

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

30 <210> 65
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 65

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

40 <210> 66
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 66

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

- 5 <210> 67
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 67

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

- 15 <210> 68
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 68

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

- 25 <210> 69
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 69

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

- 35 <210> 70
- <211> 13
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 70

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 13
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 71

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 72
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 72

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 73

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 74

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

<210> 75
 <211> 13

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 75

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

10 <210> 76
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 76

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

20 <210> 77
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 77

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

30 <210> 78
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

35 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 78

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5 10

40 <210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 79

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

- 5 <210> 80
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 80

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

- 15 <210> 81
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 81

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

- 25 <210> 82
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 82

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

- 35 <210> 83
- <211> 12
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 83

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 84
 <211> 12
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 84

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 85
 <211> 12
 <212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 85

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 86

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

<210> 87
 <211> 12
 <212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 87

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

<210> 88
 <211> 12
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 88

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 89

<211> 12

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 89

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 90

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 90

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10

<210> 91

<211> 12

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 91

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 92

<211> 11

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 92

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5 10

- 5 <210> 93
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 10 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 93

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

- 15 <210> 94
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 20 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 94

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

- 25 <210> 95
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 30 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 95

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

- 35 <210> 96
- <211> 11
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 40 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 96

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

- <210> 97
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 97
- 10 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10
- <210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 98
- 20 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10
- <210> 99
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 99
- 30 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10
- <210> 100
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 100
- 40 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10
- <210> 101
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 101

5 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Gly Arg Pro Gly Glu
1 5 10

<210> 102

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 102

15 Gly Glu Ala Ala Ala Gly Arg Pro Gly Glu Ala
1 5 10

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 103

25 Gly Ala Ala Ala Gly Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5 10

<210> 104

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 104

35 Ala Ala Ala Gly Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5 10

<210> 105

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 105

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 106
 <211> 10
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 106

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 107
 <211> 10
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 107

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5 10

<210> 108
 <211> 10
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 108

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5 10

<210> 109
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 109

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5 10

<210> 110
 <211> 10
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 110

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

<210> 111

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 111

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 112

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 112

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5 10

<210> 113

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 113

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5 10

<210> 114

<211> 10

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 114

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5 10

- 5 <210> 115
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 10 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 115

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5 10

- 15 <210> 116
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 20 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 116

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5 10

- 25 <210> 117
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 30 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 117

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5 10

- 35 <210> 118
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 40 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 118

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5 10

- <210> 119
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 119
- 10 Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5 10
- <210> 120
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 120
- 20 Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
 1 5 10
- <210> 121
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 121
- 30 Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
 1 5
- <210> 122
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 122
- 40 Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5
- <210> 123
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 123

5 Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

<210> 124

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 124

15 Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

<210> 125

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 125

25 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

<210> 126

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 126

35 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 127

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

40 <220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 127

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

<210> 128

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 128

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

<210> 129

<211> 9

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 129

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 130

Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

<210> 131

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 131

Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

<210> 132

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 132

Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1. 5

<210> 133

<211> 9

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 133

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5

<210> 134

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 134

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5

<210> 135

<211> 9

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 135

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
 1 5

<210> 136

<211> 9

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 136

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

- 5 <210> 137
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 10 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 137

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

- 15 <210> 138
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 20 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 138

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

- 25 <210> 139
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 30 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 139

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5

- 35 <210> 140
- <211> 8
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

- 40 <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 140

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

- <210> 141
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 141
- 10 Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5
- <210> 142
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 142
- 20 Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5
- <210> 143
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 143
- 30 Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
 1 5
- <210> 144
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 144
- 40 Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
 1 5
- <210> 145
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 145
- 5 Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
1 5
- <210> 146
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 146
- 15 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5
- <210> 147
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 147
- 25 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5
- <210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 148
- 35 Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
1 5
- <210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 149

Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

<210> 150
<211> 8
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 150

Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5

<210> 151
<211> 8
<212> PRT
15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 151

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 152

Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5

<210> 153
<211> 8
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 153

Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 154
<211> 7
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 154

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5

<210> 155

<211> 7

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 155

Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala
 1 5

<210> 156

<211> 7

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 156

Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala
 1 5

<210> 157

<211> 7

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 157

Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5

<210> 158

<211> 7

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 158

Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly
1 5

5 <210> 159

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 159

Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5

15 <210> 160

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 160

Thr Ala Ala Lys Gly Glu Ala
1 5

25 <210> 161

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 161

Ala Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

35 <210> 162

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 162

Ala Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

- <210> 163
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 163
- 10 Lys Gly Glu Ala Ala Ala Glu
 1 5
- <210> 164
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 164
- 20 Gly Glu Ala Ala Ala Glu Arg
 1 5
- <210> 165
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 165
- 30 Glu Ala Ala Ala Glu Arg Pro
 1 5
- <210> 166
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 166
- 40 Ala Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5
- <210> 167
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 167
- 5 Ala Ala Glu Arg Pro Gly Glu
1 5
- <210> 168
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 168
- 15 Ala Glu Arg Pro Gly Glu Ala
1 5
- <210> 169
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 169
- 25 Glu Arg Pro Gly Glu Ala Ala
1 5
- <210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 170
- 35 Arg Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5
- <210> 171
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 171

Pro Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5

<210> 172

<211> 6

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 172

Gly Ala Gln Phe Ser Lys
1 5

<210> 173

<211> 6

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 173

Ala Gln Phe Ser Lys Thr
1 5

<210> 174

<211> 6

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 174

Gln Phe Ser Lys Thr Ala
1 5

<210> 175

<211> 6

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 175

Phe Ser Lys Thr Ala Ala
1 5

<210> 176

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 176

Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5

<210> 177

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 177

Lys Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5

<210> 178

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 178

Thr Ala Ala Lys Gly Glu
 1 5

<210> 179

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 179

Ala Ala Lys Gly Glu Ala
 1 5

<210> 180

<211> 6

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 180

Ala Lys Gly Glu Ala Ala
1 5

5 <210> 181

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 181

Lys Gly Glu Ala Ala Ala
1 5

15 <210> 182

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 182

Gly Glu Ala Ala Ala Gly
1 5

25 <210> 183

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 183

Glu Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

35 <210> 184

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 184

Ala Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

- <210> 185
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 185
- 10 Ala Ala Glu Arg Pro Gly
 1 5
- <210> 186
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 186
- 20 Ala Glu Arg Pro Gly Glu
 1 5
- <210> 187
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 187
- 30 Glu Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5
- <210> 188
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 188
- 40 Arg Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5
- <210> 189
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 189
- 5 Pro Gly Glu Ala Ala Val
1 5
- <210> 190
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 190
- 15 Gly Glu Ala Ala Val Ala
1 5
- <210> 191
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 191
- 25 Gly Ala Gln Phe Ser
1 5
- <210> 192
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 192
- 35 Ala Gln Phe Ser Lys
1 5
- <210> 193
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 193

Gln Phe Ser Lys Thr
 1 5
 <210> 194
 <211> 5
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 10 <400> 194
 Phe Ser Lys Thr Ala
 1 5
 <210> 195
 <211> 5
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 20 <400> 195
 Ser Lys Thr Ala Ala
 1 5
 <210> 196
 <211> 5
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 30 <400> 196
 Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5
 <210> 197
 <211> 5
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
 <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
 40 <400> 197
 Thr Ala Ala Lys Gly
 1 5
 <210> 198
 <211> 5
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 198

A1a A1a Lys G1y G1u
1 5

<210> 199

<211> 5

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 199

A1a Lys G1y G1u A1a
1 5

<210> 200

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 200

Lys G1y G1u A1a A1a
1 5

<210> 201

<211> 5

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 201

G1y G1u A1a A1a A1a
1 5

<210> 202

<211> 5

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 202

Glu Ala Ala Ala Glu
1 5

5 <210> 203
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 203

Ala Ala Ala Glu Arg
1 5

15 <210> 204
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 204

Ala Ala Glu Arg Pro
1 5

25 <210> 205
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 205

Ala Glu Arg Pro Gly
1 5

35 <210> 206
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 206

Glu Arg Pro Gly Glu
1 5

- <210> 207
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 207
- 10 Arg Pro Gly Glu Ala
 1 5
- <210> 208
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 208
- 20 Pro Gly Glu Ala Ala
 1 5
- <210> 209
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 25 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 209
- 30 Gly Glu Ala Ala Val
 1 5
- <210> 210
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 210
- 40 Glu Ala Ala Val Ala
 1 5
- <210> 211
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 45 <220>

- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 211
- 5 **Gly Ala Gln Phe**
 1
- <210> 212
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 10 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 212
- 15 **Ala Gln Phe Ser**
 1
- <210> 213
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 213
- 25 **Gln Phe Ser Lys**
 1
- <210> 214
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 214
- 35 **Phe Ser Lys Thr**
 1
- <210> 215
- <211> 4
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 40 <220>
- <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <220>
- <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
- <400> 215

Ser Lys Thr Ala

1

<210> 216

<211> 4

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 216

Lys Thr Ala Ala

1

<210> 217

<211> 4

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 217

Thr Ala Ala Lys

1

<210> 218

<211> 4

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 218

Ala Ala Lys Gly

1

<210> 219

<211> 4

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 219

Ala Lys Gly Glu

1

<210> 220

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 220

Lys G₁y G₁u A₁a
1

<210> 221

<211> 4

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 221

G₁y G₁u A₁a A₁a
1

<210> 222

<211> 4

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 222

G₁u A₁a A₁a A₁a
1

<210> 223

<211> 4

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 223

A₁a A₁a A₁a G₁u
1

<210> 224

<211> 4

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 224

Ala Ala Glu Arg
1

5 <210> 225

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 225

Ala Glu Arg Pro
1

15 <210> 226

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 226

Glu Arg Pro Gly
1

25 <210> 227

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

30 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 227

Arg Pro Gly Glu
1

35 <210> 228

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

40 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 228

Pro Gly Glu Ala
1

- <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 5 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 233
- Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10
- 10 <210> 234
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 15 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 234
- Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu
1 5 10
- 20 <210> 235
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 25 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 235
- Gly Lys Gln Phe Ser Lys Thr Lys Ala Lys Gly Glu
1 5 10
- 30 <210> 236
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 35 <220>
<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado
<400> 236
- Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys
1 5 10
- 40 <210> 237
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- <220>
<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 237

Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

5 <210> 238

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 238

Gly Ala Glu Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Glu
1 5 10

15 <210> 239

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

20 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 239

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala Gly Glu
1 5 10

25 <210> 240

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 240

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Ala Glu
1 5 10

35 <210> 241

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

40 <223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 241

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys Gly Ala
 1 5 10

<210> 242

<211> 10

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

10 <400> 242

Ala Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 243

<211> 10

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

20 <400> 243

Gly Ala Ala Phe Ser Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 244

<211> 10

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

30 <400> 244

Gly Ala Gln Phe Ala Lys Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 245

<211> 10

<212> PRT

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

40 <400> 245

Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 246

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

5 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 246

Lys Ala Ala Thr Lys Ser Phe Gln Ala Gly
 1 5 10

<210> 247

<211> 10

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

15 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 247

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Ala Ala Ala Lys
 1 5 10

<210> 248

<211> 10

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

25 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 248

Gly Ala Gln Phe Ser Lys Thr Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 249

<211> 10

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

35 <223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 249

Gly Ala Gln Phe Ser Ala Thr Ala Ala Ala
 1 5 10

<210> 250

<211> 8

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 250

Gly Ala Gln Ala Ser Lys Thr Ala
 1 5

5 <210> 251

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 251

Ala Ala Gly Glu
 1

15 <210> 252

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <220>

<223> El péptido puede o no ser C-terminal y/o N-terminal modificado

<400> 252

Gly Lys Ala Ser Gln Phe Ala Lys Thr Ala
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un péptido para uso en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino, enfermedades de la piel, enfermedades autoinmunes, o un síndrome de dolor, donde dicho péptido se selecciona del grupo que consiste en:
- 5 acetil-GAQFSKTAAK (SEC ID NO: 106), acetil-GAOFSKTAAKGEAAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 1), acetil-GAQFSKTAAKGEAAAERPGE (SEC ID NO: 11), acetil-GAQFSKTAAKGEEAAE (SEC ID NO: 37), acetil-AKGEAAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 45), acetil-GAQFSKTAAKGE (SEC ID NO: 79), acetil-AAAERPGEAAVA (SEC ID NO: 91), acetil-GAOFSKTAA (SEC ID NO: 121), acetil-TAAKGEAA (SEC ID NO: 143), acetil-RPGEAAVA (SEC ID NO: 153), acetil-AKGE (SEC ID NO: 219), acetil-GAOFSKTAAAGE (SEC ID NO: 239), acetil-GAOFSKTAAA (SEC ID NO: 248), acetil-GAQFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 79), acetil-AQFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 93), acetil-QFSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 108), acetil-FSKTAAKGE-NH₂ (SEC ID N°: 124), acetil-SKTAAKGE-NH₂ (SEC ID NO: 141), y acetil-AKGE-NH₂ (SEC ID NO: 219).
- 10
2. El péptido para uso según la reivindicación 1, donde el péptido está en una cantidad terapéuticamente eficaz reductora de la liberación de un mediador de la inflamación y reduce la cantidad de por lo menos un mediador de la inflamación liberado por lo menos por una célula inflamatoria en comparación con la liberación de dicho mediador de la inflamación por lo menos por una célula inflamatoria del mismo tipo que se produciría en ausencia de dicho péptido.
- 15
3. El péptido para uso según la reivindicación 2, donde dicho al menos un mediador de la inflamación se selecciona del grupo que consiste en mieloperoxidasa (MPO), peroxidasa de eosinófilos (EPO), proteína básica principal (MBP), lisozima, granzima, histamina, proteoglicano, proteasa, un factor quimiotáctico, citoquina, un metabolito de ácido araquidónico, defensina, la proteína bactericida que aumenta la permeabilidad (BPI), elastasa, catepsina G, catepsina B, catepsina D, beta-D-glucuronidasa, alfa-manosidasa, fosfolipasa A₂, condroitin-4-sulfato, proteinasa 3, lactoferrina, colagenasa, activador del complemento, receptor del complemento, receptor de N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (FMLP), receptor de laminina, citocromo b₅₅₈, factor quimiotáctico de monocitos, histaminasa, proteína de unión a la vitamina B12, gelatinasa, activador del plasminógeno, beta-D-glucuronidasa, y una combinación de los mismos.
- 20
- 25
4. El péptido para uso según la reivindicación 3, donde el al menos un mediador de la inflamación es la peroxidasa de eosinófilo (EPO).
5. El péptido para uso según la reivindicación 3, donde el al menos un mediador de la inflamación es lisozima.
6. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el péptido se combina con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30
7. El péptido para uso según la reivindicación 2, donde dicha célula inflamatoria se selecciona del grupo que consiste en un leucocito, un granulocito, un neutrófilo, un basófilo, un eosinófilo, un monocito, un macrófago y una combinación de los mismos.
- 35
8. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la cantidad terapéuticamente eficaz reductora de la liberación de un mediador de la inflamación de dicho péptido comprende una cantidad de péptido inhibidora de la desgranulación que reduce la cantidad de por lo menos un mediador de la inflamación liberado por lo menos por una célula inflamatoria de entre 5 a 99% en comparación con la cantidad liberada por lo menos por una célula inflamatoria en ausencia del péptido.
- 40
9. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde el péptido se administra mediante administración tópica, administración parenteral, administración rectal, administración pulmonar, administración nasal, o administración oral,
- 45
10. El péptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, con una segunda molécula seleccionada del grupo que consiste en un antibiótico, un compuesto antiviral, un compuesto anti-parasitario, un compuesto anti-inflamatorio, y un inmunomodulador.
11. El péptido para uso según la reivindicación 2, donde el al menos un mediador de la inflamación es la mieloperoxidasa (MPO).

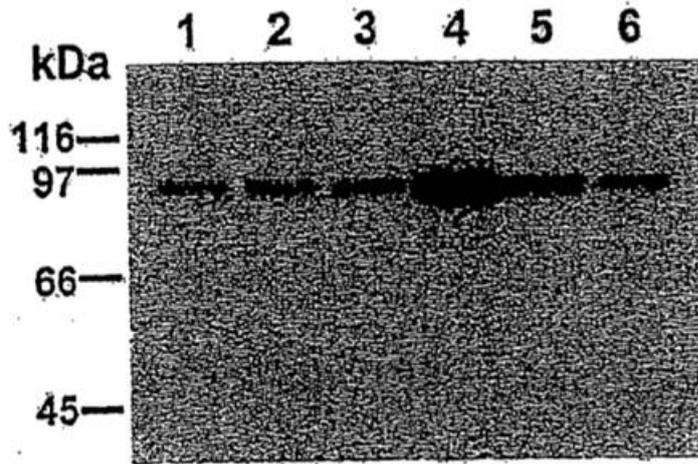


FIG. 1A

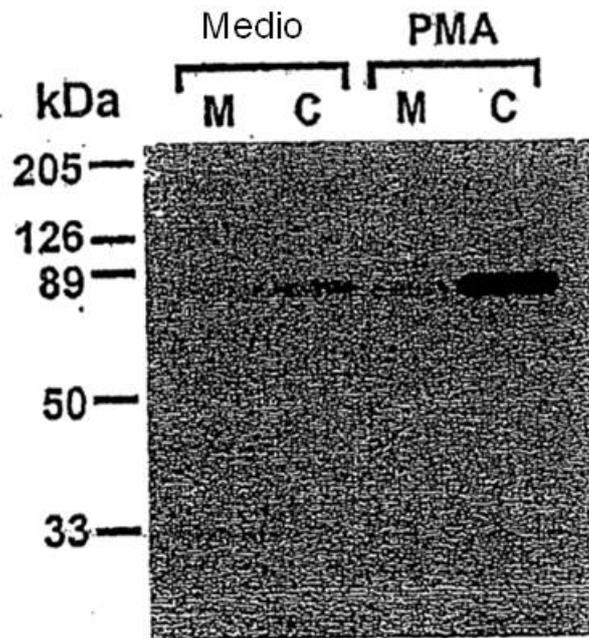


FIG. 1B

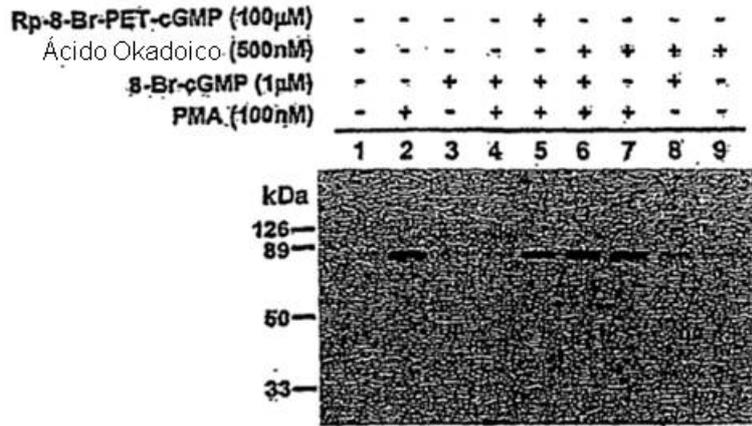


FIG. 2A

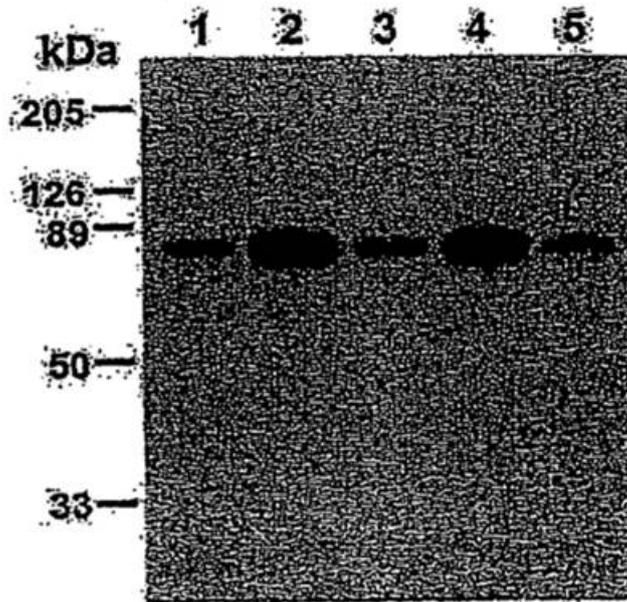


FIG. 2B

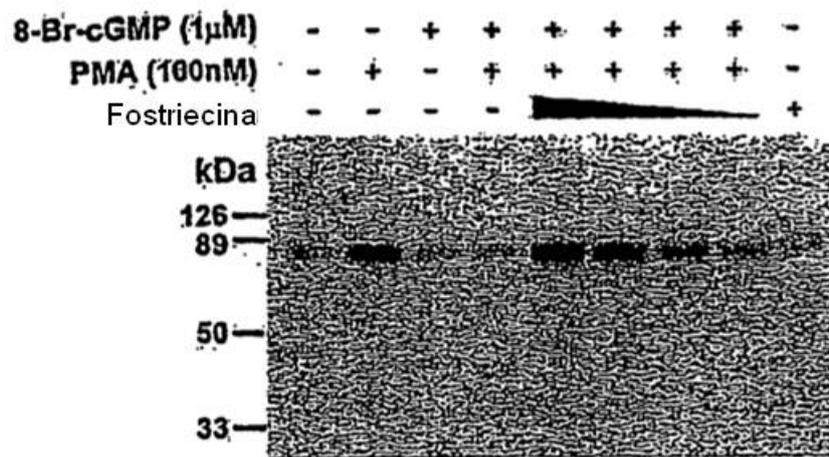


FIG. 2C

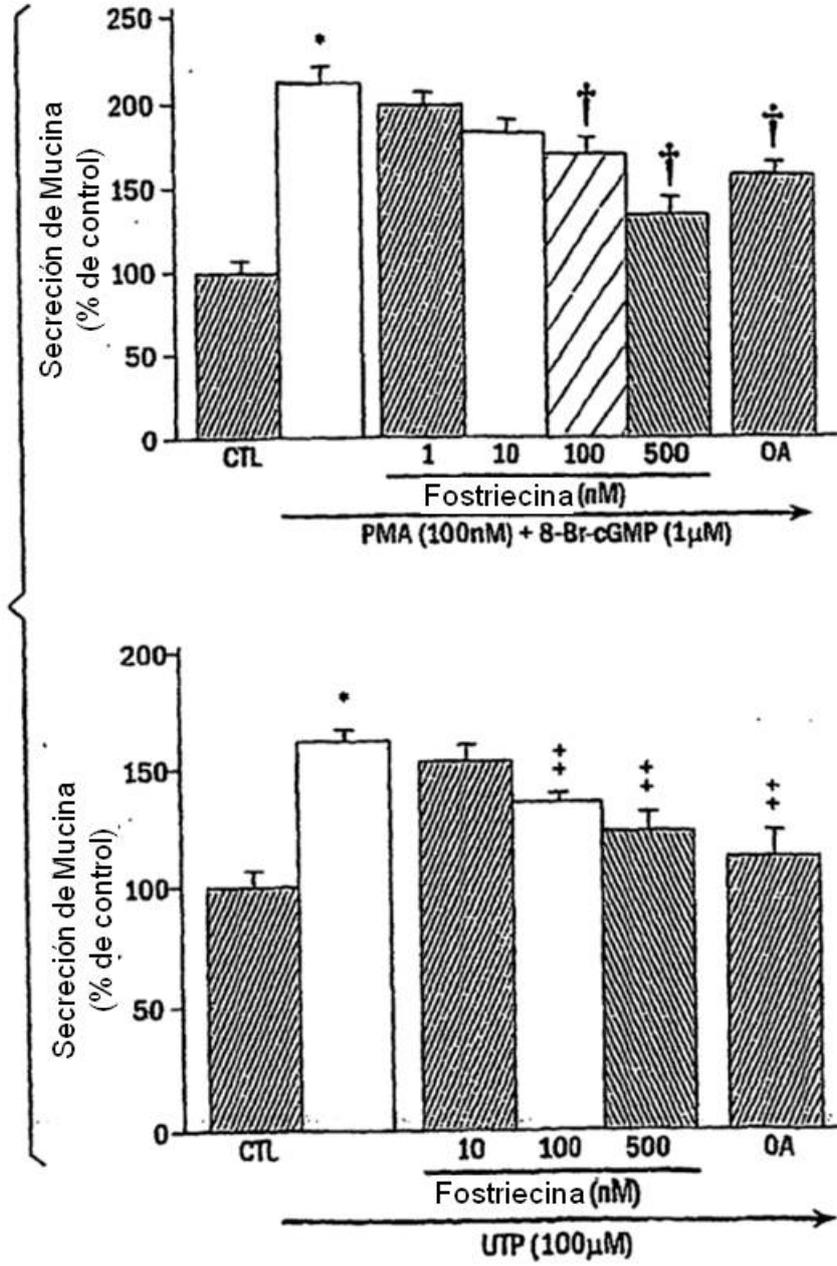


FIG. 3

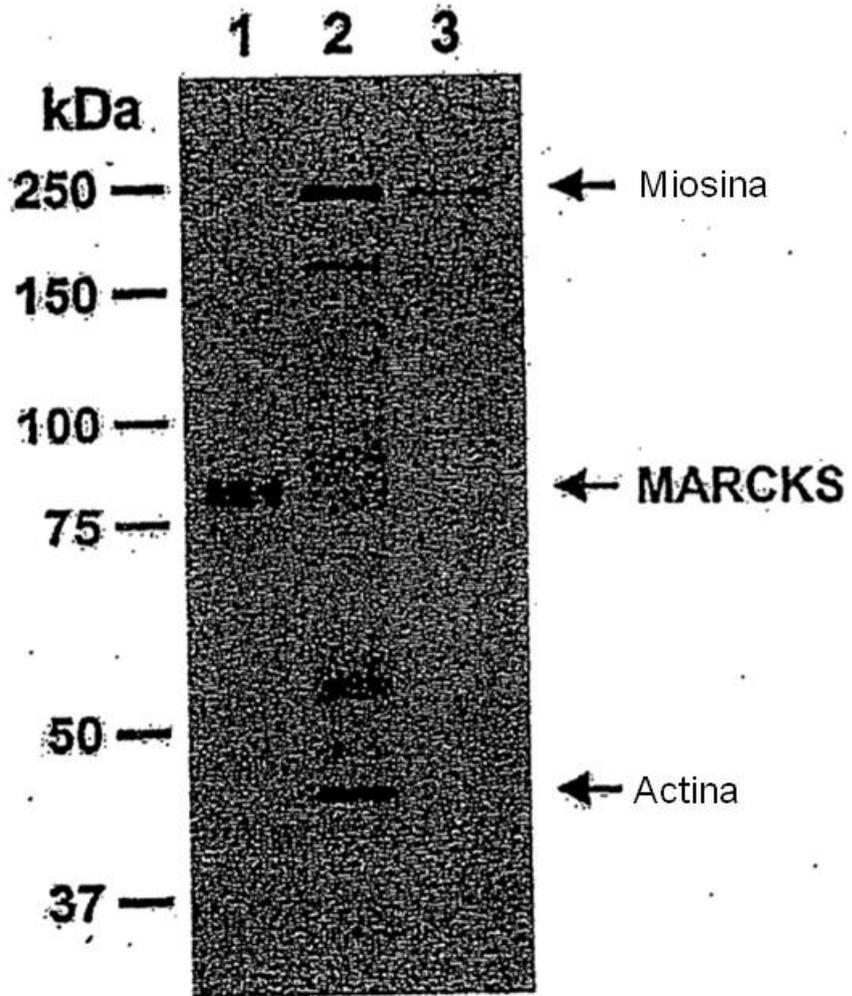


FIG. 4

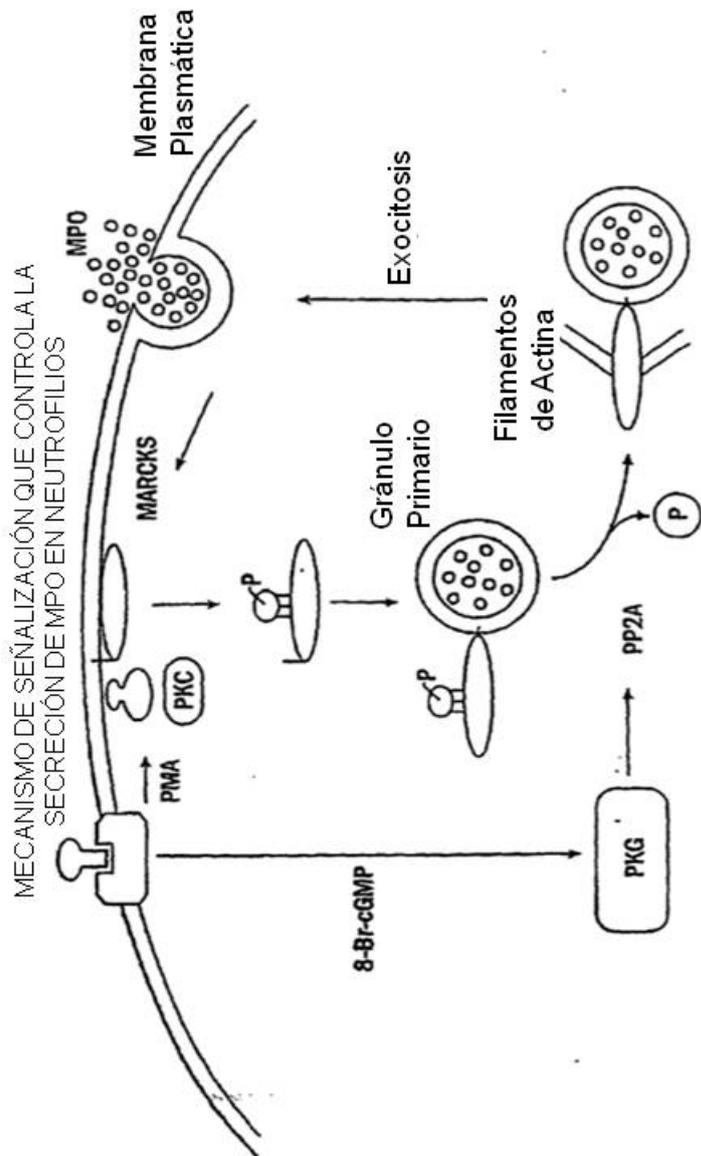


FIG. 5

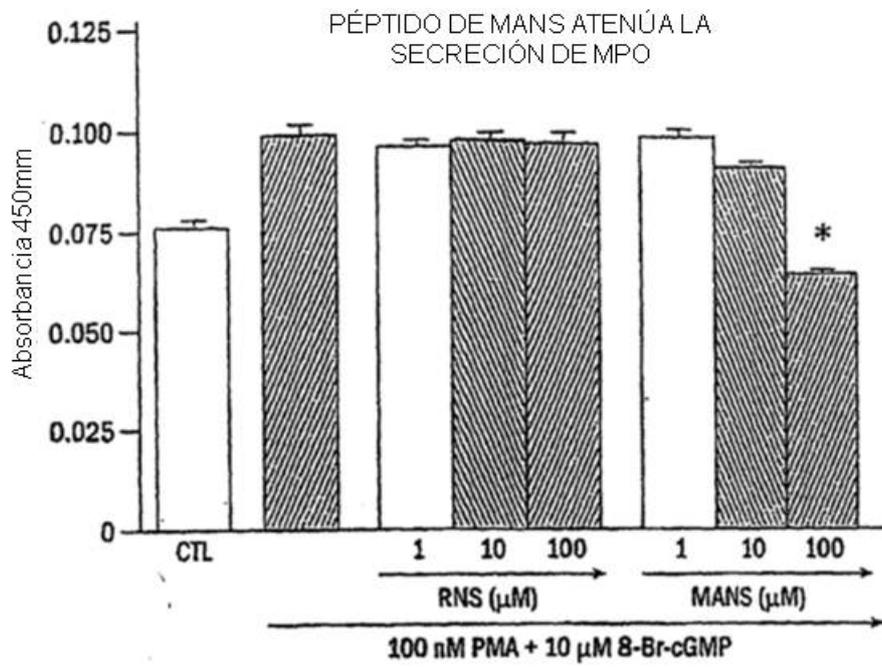


FIG. 6

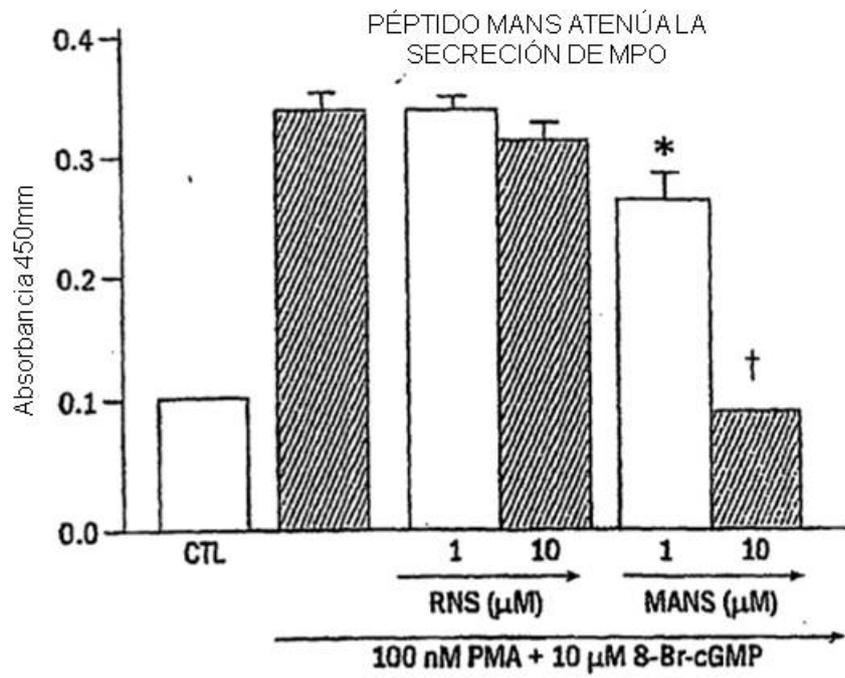


FIG. 7

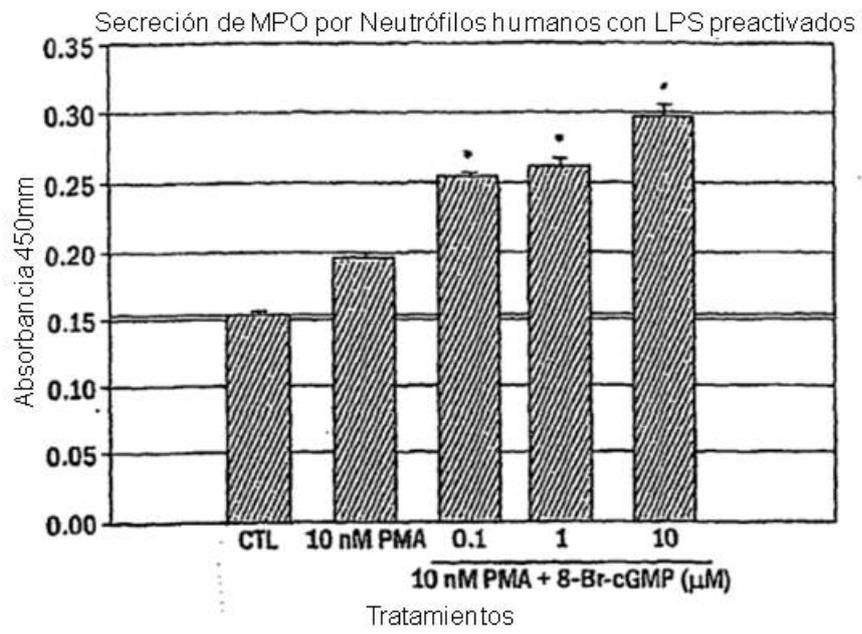


FIG. 8

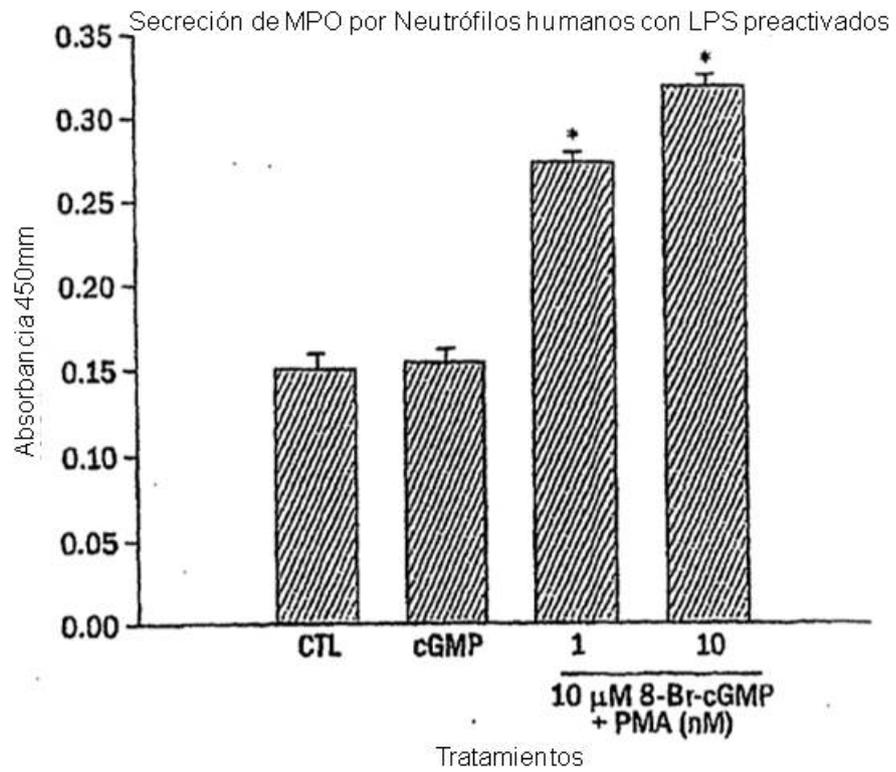


FIG. 9

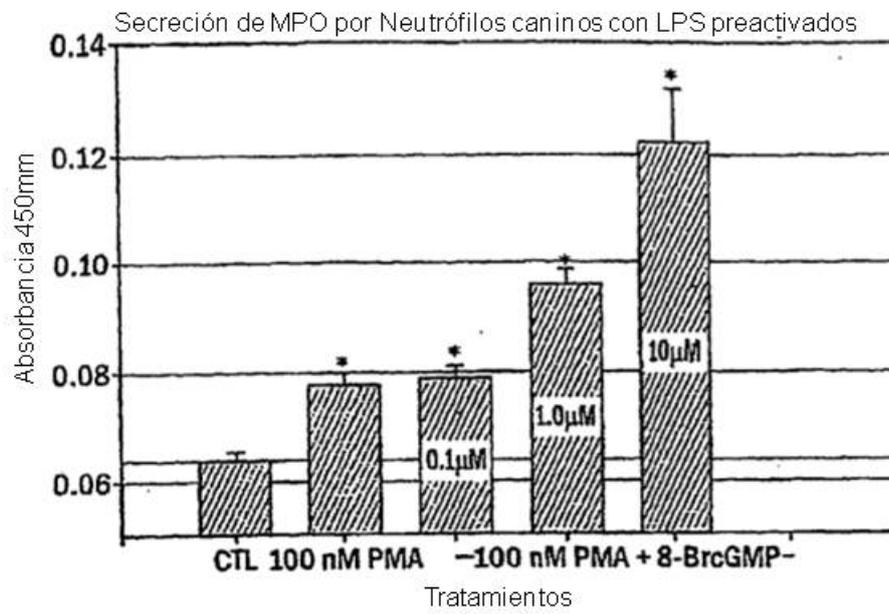


FIG. 10

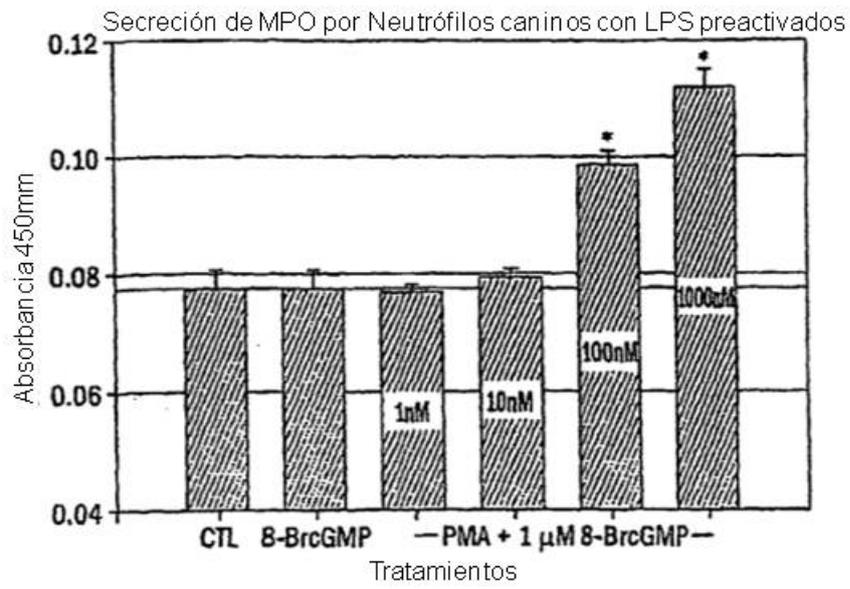


FIG. 11

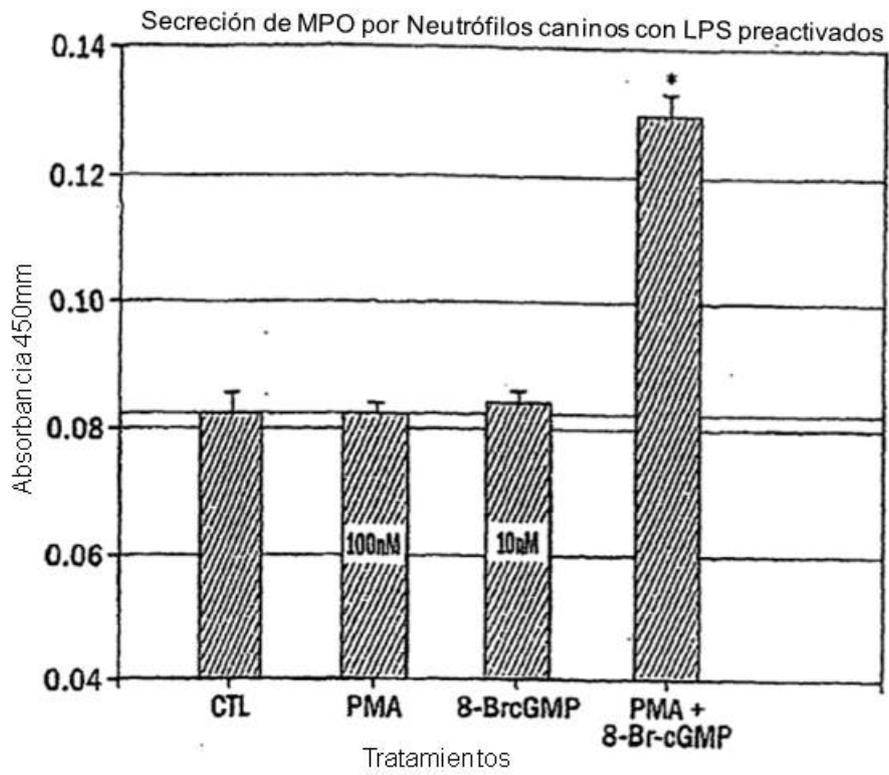


FIG. 12