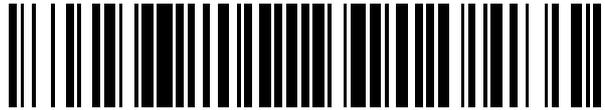


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 511**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 31/00** (2006.01)  
**C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008 E 12152769 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.08.2014 EP 2465522**

54 Título: **Quemerina-15h y su uso para el tratamiento de inflamación y choque endotóxico**

30 Prioridad:

**22.03.2007 GB 0705488**

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

**26.11.2014**

73 Titular/es:

**ISIS INNOVATION LIMITED (100.0%)  
Ewert House Ewert Place  
Summertown, Oxford OX2 7SQ, GB**

72 Inventor/es:

**GREAVES, DAVID, R;  
RUSS, ANDREAS y  
CASH, JENNA, L.**

74 Agente/Representante:

**CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel**

**ES 2 523 511 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

Quemerina-15h y su uso para el tratamiento de inflamación y choque endotóxico

Esta invención se refiere al tratamiento de inflamación y/o choque endotóxico y/o a la reducción de los niveles de quimiocinas inflamatorias, y a péptidos y composiciones para su uso en el tratamiento de inflamación y/o choque endotóxico, o para la reducción de los niveles de mediadores inflamatorios.

La inflamación es un componente de la patogénesis de muchas enfermedades humanas y animales, así como que surge como resultado de daño físico, químico o traumático a tejidos en un cuerpo humano o animal. En general, la respuesta inmunitaria da como resultado la liberación sistémica de mediadores químicos endógenos que provocan vasodilatación, migración de neutrófilos, quimiotaxis y aumento de la permeabilidad vascular. La respuesta inmunitaria es esencialmente la misma independientemente de dónde se produzca y de cuál sea la causa. La respuesta puede ser aguda (de vida corta) o puede ser crónica (de larga duración).

Se cree que el choque endotóxico, a menudo denominado también choque septicémico, se produce debido a la exposición intravascular a grandes cantidades de endotoxina que da como resultado una respuesta similar a la inflamación. La exposición a la endotoxina da como resultado la producción de varias citocinas, incluyendo TNF $\alpha$  e IL-1. Se estimulan también el sistema del complemento y la cascada de la coagulación, incluyendo el factor VII. El resultado de esta reacción puede ser daño tisular, fiebre, vasodilatación, taquicardia y coagulación intravascular.

Una respuesta inflamatoria normalmente es beneficiosa, proporcionando al sitio de inflamación un aumento del acceso a nutrientes, oxígeno, anticuerpos y fármacos terapéuticos, así como un aumento de la formación de fibrina y dilución de toxinas. Sin embargo, si no se desea la inflamación o se prolonga, entonces puede provocar daño al tejido. En tales situaciones, a menudo se usan fármacos antiinflamatorios. Existen dos tipos principales de fármacos antiinflamatorios, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).

La mayoría de estos fármacos tienen efectos secundarios no deseados. La administración prolongada de corticosteroides con frecuencia se asocia a efectos secundarios graves que imitan a la enfermedad de Cushing, una disfunción de las glándulas suprarrenales que da como resultado la sobreproducción de cortisol. Otros posibles efectos secundarios incluyen aumento de peso, depósitos de grasa en el pecho, la cara, el cuello y la parte superior de la espalda, edema, hipertensión, diabetes, mala cicatrización de heridas, aumento de la susceptibilidad a infección, adelgazamiento de la piel, cambios de humor y depresión. Los efectos secundarios más graves de los AINE son insuficiencia renal, insuficiencia hepática, úlceras y hemorragia prolongada tras una lesión o cirugía. Algunos individuos son alérgicos a los AINE y las personas con asma tienen un riesgo superior de experimentar una reacción alérgica grave a la aspirina. Por tanto, existe una necesidad de identificar agentes alternativos que tengan efectos antiinflamatorios.

La quemerina es una proteína abundante presente en varios exudados inflamatorios humanos incluyendo líquido ascítico y sinovial (Wittamer V *et al.* J Exp Med. 6 de octubre de 2003; 198(7):977-985; Meder Wet *et al.* FEBS Lett. 18 de diciembre de 2003; 555(3):495-499). La quemerina humana se secreta como un precursor de 163 aminoácidos (aa) denominado proquemerina (el equivalente murino de *Mus musculus* es de 162 aa) que experimenta truncamiento N- y C-terminal para generar una proteína quimiotáctica de 137 aa (140 aa en *Mus musculus*) (Wittamer V *et al.* J Exp Med. 6 de octubre de 2003; 198(7):977-985; Zabel BA *et al.* J Biol Chem. 14 de octubre de 2005; 280(41):34661-34666; Wittamer V *et al.* J Immunol. 1 de julio de 2005; 175 (1):487-493; Samson M *et al.* Eur J Immunol. Mayo de 1998; 28(5):1689-1700). La estructura predicha para la quemerina indica similitudes estructurales con quimiocinas y se ha descrito como una quimiocina "inversa", que presenta posiblemente un extremo carboxilo-terminal desordenado, una lámina plegada en  $\alpha$  y un dominio amino-terminal de hélice  $\beta$  (Zabel BA *et al.* Exp Hematol. Agosto de 2006; 34(8):1021-1032). La estructura es reminiscente del pliegue de cistatina presente en catelicidinas y cininógenos que también experimentan procesamiento proteolítico para lograr la activación (Zabel BA *et al.* Exp Hematol. Agosto de 2006; 34(8):1106-1114; Colman RW, Biol Chem. Enero de 2001; 382(1):65-70; Yamasaki K *et al.* FASEB J. 1 de octubre de 2006; 20(12):2068-2080).

Wittamer *et al.* (J. Biol. Chem. (2004) 279 (ii) 9956-9962) describen experimentos para demostrar péptidos a partir del extremo C-terminal de quemerina con un efecto agonista sobre el receptor ChemR23. Estudios de delección confirmaron la importancia del procesamiento C-terminal de proquemerina e identificaron un nonopéptido con fuerte actividad agonista.

Según un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de un péptido aislado tal como se define en la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico, y/o la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, y/o el tratamiento de una herida.

Según un aspecto aún adicional, la presente invención proporciona uno o más péptidos tal como se definen en la

reivindicación 1 o la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación, y/o en el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico, y/o para reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios, y/o el tratamiento de una herida.

- 5 El uno o más mediadores inflamatorios pueden incluir citocinas, quimiocinas y lípidos que median en la inflamación. El mediador inflamatorio puede incluir una o más quimiocinas seleccionadas del grupo que comprende TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-2 (CCL8), GRO $\alpha$  (CXCL1), GRO $\beta$  (CXCL2), IL-8 (CXCL8), TECK (CCL25), MCP-1 (CCL2), interferón  $\gamma$  y RANTES (CCL5). Preferiblemente, el medicamento puede reducir los niveles de TNF $\alpha$ .

Sorprendentemente, los péptidos derivados del extremo C-terminal de la proteína quemerina tienen propiedades antiinflamatorias, y pueden usarse para tratar, prevenir o mejorar la inflamación y/o el choque endotóxico.

- 10 El medicamento puede tener un uso terapéutico y/o profiláctico.

La referencia a una proteína quemerina significa la forma procesada de quemerina, en la que los aminoácidos N-terminales encontrados en la preproquemerina se han eliminado proteolíticamente, y los aminoácidos C-terminales encontrados en el precursor de proquemerina se han eliminado proteolíticamente para producir la forma truncada activa de la proteína denominada quemerina.

- 15 Preferiblemente el péptido se deriva de una forma humana o no humana de quemerina. Preferiblemente el péptido se deriva de una forma humana o de mamífero de quemerina. La quemerina no humana de mamífero puede derivarse de un roedor, tal como una rata o un ratón, un caballo, un perro, un gato, una vaca, una oveja o un cerdo.

- 20 Preferiblemente el péptido derivado del extremo C-terminal de una proteína quemerina tiene una identidad de al menos el 80%, el 90% o superior con la secuencia de péptido que se produce de manera natural en el extremo C-terminal de la proteína quemerina.

Preferiblemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, el 90% o superior con entre aproximadamente los últimos 5 y aproximadamente los últimos 30, preferiblemente entre aproximadamente los últimos 10 y aproximadamente los últimos 25, aminoácidos que se producen de manera natural en el extremo C-terminal de una proteína quemerina.

- 25 Preferiblemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente el 80%, el 90% o superior con entre 5 y 25 aminoácidos en los últimos 30 aminoácidos que se producen de manera natural en el extremo C-terminal de una proteína quemerina.

La referencia a los "últimos aminoácidos" en la proteína quemerina se refiere a los aminoácidos en el extremo C-terminal de la proteína.

- 30 En la figura 2A se facilita la secuencia de longitud completa de quemerina, proquemerina y preproquemerina humana y murina, y se refleja en SEQ ID NO: 31, 32, 33, respectivamente para las proteínas humanas, y SEQ ID NO: 34, 35, 36, respectivamente para las proteínas de ratón. Preferiblemente el péptido de quemerina tiene la secuencia de SEQ ID NO: 31 ó 34. La secuencia de proteínas quemerina de otras especies, tales como bovina y de rata, están disponibles fácilmente de GenBank y los expertos en la técnica pueden acceder fácilmente a las mismas.

- 35 Preferiblemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, el 90% o superior con entre los últimos 5 y los últimos 30 aminoácidos de la quemerina según SEQ ID NO: 31 (secuencia humana) y SEQ ID NO: 34 (secuencia de ratón).

- 40 El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de residuos de aminoácido en una secuencia que son idénticos con los aminoácidos en la proteína quemerina que se produce de manera natural tras alinear las secuencias e introducir espacios si es necesario para lograr el porcentaje de identidad de secuencia máximo. La alineación con fines de determinación del porcentaje de la identidad de secuencia puede lograrse de muchas maneras que el experto en la técnica conoce bien, e incluyen, por ejemplo, usar los algoritmos BLAST y ALIGN.

- 45 El péptido puede contener adiciones, inserciones, deleciones, inversiones o translocaciones con respecto a la secuencia natural del extremo C-terminal de una proteína quemerina, siempre que el péptido tenga al menos el 50% de la actividad antiinflamatoria de, y/o al menos el 50% de la actividad anti-choque endotóxico de, y/o la capacidad para reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios en al menos el 50% en comparación con un péptido que tiene la secuencia natural.

Los términos "análogo" o "derivado" se refieren a péptidos que tienen una secuencia diferente a la secuencia que se

## ES 2 523 511 T3

produce de manera natural pero que comprende esencialmente la misma o más, y al menos aproximadamente el 50%, preferiblemente de manera aproximada el 60%, el 70%, el 80% o el 90%, de la actividad antiinflamatoria, y/o la actividad anti-choque endotóxico, actividad reductora de mediadores inflamatorios, observada con un péptido que tiene una secuencia que se produce de manera natural.

5 El péptido puede estar acetilado, acilado, alquilado, glicosilado, y similares.

El péptido, análogo o derivado puede ser parte de una proteína de fusión.

El péptido puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos que se produce de manera natural.

Se dan a conocer los siguientes péptidos:

- 10 PHGYFLPGQFA (Quemerina11-ratón; C11m; SEQ ID NO: 1);  
PHGYFLPGQFAF (Quemerina12-ratón; C12m; SEQ ID NO: 2);  
PHGYFLPGQFAFS (Quemerina13-ratón; C13m; SEQ ID NO: 3);  
AGEDPHGYFLPGQFA (Quemerina15-ratón; C15m; SEQ ID NO: 4);  
AGEDPHGYFLPGQFAF (Quemerina16-ratón; C16m; SEQ ID NO: 5);
- 15 AGEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina17-ratón; C17m; SEQ ID NO: 6);  
DPHGYFLPGQFA (Quemerina12A-ratón; C12Am; SEQ ID NO: 7);  
EDPHGYFLPGQFA (Quemerina13A-ratón; C13Am; SEQ ID NO: 8);  
GEDPHGYFLPGQFA (Quemerina14A-ratón; C14Am; SEQ ID NO: 9);  
DPHGYFLPGQFAF (Quemerina13B-ratón; C13Bm; SEQ ID NO: 10);
- 20 EDPHGYFLPGQFAF (Quemerina14B-ratón; C14Bm; SEQ ID NO: 11);  
GEDPHGYFLPGQFAF (Quemerina15A-ratón; C15Am; SEQ ID NO: 12);  
DPHGYFLPGQFAFS (Quemerina14C-ratón; C14Cm; SEQ ID NO: 13);  
EDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina15B-ratón; C15Bm; SEQ ID NO: 14);  
GEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina16A-ratón; C16Am; SEQ ID NO: 15);
- 25 PHSFYFPGQFA (Quemerina11-humana; C11h; SEQ ID NO: 16);  
PHSFYFPGQFAF (Quemerina12-humana; C12h; SEQ ID NO: 17);  
PHSFYFPGQFAFS (Quemerina13-humana; C 13h; SEQ ID NO: 18);  
AGEDPHSFYFPGQFA (Quemerina15-humana; C15h; SEQ ID NO: 19);  
AGEDPHSFYFPGQFAF (Quemerina16-humana; C16h; SEQ ID NO: 20);
- 30 AGEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina17-humana; C17h; SEQ ID NO: 21);  
DPHSFYFPGQFA (Quemerina12A-humana; C12Ah; SEQ ID NO: 22);  
EDPHSFYFPGQFA (Quemerina13A-humana; C13Ah; SEQ ID NO: 23);  
GEDPHSFYFPGQFA (Quemerina14A-humana; C14Ah; SEQ ID NO: 24);

DPHSFYFPGQFAF (Quemerina13B-humana; C13Bh; SEQ ID NO: 25);

EDPHSFYFPGQFAF (Quemerina14B-humana; C14Bh; SEQ ID NO: 26);

GEDPHSFYFPGQFAF (Quemerina15A-humana; C15Ah; SEQ ID NO: 27);

DPHSFYFPGQFAFS (Quemerina14C-humana; C14Ch; SEQ ID NO: 28);

5 EDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina15B-humana; C15Bh; SEQ ID NO: 29);

y

GEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina16A-humana; C16Ah; SEQ ID NO: 30);

AQAGEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina19-ratón; C19m; SEQ ID NO: 37); y

10 QRAGEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina19-humana; C19h; SEQ ID NO: 38); o análogos o derivados de los mismos.

El péptido de la invención tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, el 90% o superior con SEQ ID NO: 19.

15 El péptido puede aislarse a partir de un sistema natural, o puede producirse de manera sintética o recombinante. Los péptidos sintetizados pueden producirse mediante métodos químicos convencionales, incluyendo síntesis mediante procedimiento automatizado.

Pueden usarse péptidos recombinantes en una forma purificada. Alternativamente, puede usarse el sobrenadante de células que expresan el péptido recombinante.

El péptido, análogo o derivado puede formar parte de una proteína o complejo molecular más grande.

El péptido puede ser cíclico o de cadena lineal.

20 El péptido puede incluir una estructura principal resistente a proteasas.

El péptido puede incluir modificaciones en los extremos C-terminal y/o N-terminal.

El péptido puede estar marcado, tal como con un marcador radiactivo, marcador fluorescente, una etiqueta de espectrometría de masas, biotina o similares, mediante métodos conocidos en la técnica.

25 El medicamento puede comprender otros principios activos, incluyendo otros agentes antiinflamatorios conocidos, y/u otros agentes anti-choque endotóxico conocidos, y/u otros agentes que se sabe que reducen los niveles de quimiocinas.

30 El medicamento también puede contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente puede comprender macromoléculas grandes tales como proteínas, polisacáridos, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos, trehalosa, agregados lipídicos y partículas de virus inactivos. Los expertos en la técnica conocerán bien tales excipientes.

El medicamento también puede comprender uno o más de un agente tamponante, un agente que aumenta la viscosidad, un disolvente, un estabilizador y un conservante.

35 La vía de administración del medicamento puede ser inyección o infusión por vía parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intrarterial, intralesional, intrarticular, tópica, oral, rectal, nasal, por inhalación o cualquier otra vía adecuada.

40 La dosificación de los péptidos usados dependerá del péptido, la diana y el tratamiento. La determinación de la dosificación y de la vía de administración se encuentra bien dentro de la experiencia de un médico habitual. Los regímenes de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 1 pg/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg, más preferiblemente la dosificación será de desde aproximadamente 10 pg/kg hasta aproximadamente 1 mg/kg, más preferiblemente desde aproximadamente 10 pg/kg hasta aproximadamente 100 ng/kg. Preferiblemente estas dosificaciones son dosis al día.

Sorprendentemente se ha encontrado que una dosis tan baja como 0,32 ng/kg de un péptido según la invención tiene eficacia frente a peritonitis estéril en ratones, mientras que se requieren 1,2 mg/kg de dexametasona para observar un grado de eficacia similar.

5 Preferiblemente, un medicamento según un uso de la invención puede estar destinado para su administración a una dosis de entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, más preferiblemente a una dosis de entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 100 ng/kg, o entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 10 ng/kg. Estas dosis son al menos tres logaritmos inferiores a la dosis de dexametasona necesaria.

10 Según otro aspecto la invención proporciona un método de tratamiento, prevención o mejora de la inflamación en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos derivados del extremo C-terminal de una proteína quemerina, tal como se define en las reivindicaciones.

Según otro aspecto la invención proporciona un método de tratamiento, prevención o mejora de choque endotóxico en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos derivados del extremo C-terminal de una proteína quemerina, tal como se define en las reivindicaciones.

15 Según otro aspecto la invención proporciona un método de reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos derivados del extremo C-terminal de una proteína quemerina, tal como se define en las reivindicaciones.

El tratamiento puede ser terapéutico, profiláctico o cosmético.

20 Preferiblemente el péptido se administra en una cantidad eficaz, es decir, en una cantidad suficiente para: (i) inducir o provocar una reducción de la inflamación, o que previene o reduce la inflamación; (ii) inducir o provocar una reducción del choque endotóxico, o que previene o reduce el choque endotóxico; y/o (iii) reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios.

25 Alternativamente el medicamento de la invención puede aplicarse directamente a un dispositivo médico para reducir el riesgo de inflamación relacionada con el dispositivo. Esto puede lograrse aplicando el medicamento a la superficie del dispositivo o impregnando la superficie del dispositivo con uno o más péptidos derivados del extremo C-terminal de una proteína quemerina, tal como se define en las reivindicaciones.

Según otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo médico impregnado con uno o más péptidos tal como se define en la reivindicación 12.

El dispositivo médico puede ser una endoprótesis o un catéter.

30 Según otro aspecto, la invención proporciona un vendaje o apósito para heridas impregnado con uno o más péptidos tal como se definen en la reivindicación 1.

35 La inflamación a la que se hace referencia en cualquier aspecto de la invención puede estar asociada con un estado tal como artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmunitaria (pancitopenia inmunitaria, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmunitaria (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia inmunomediada), tiroiditis (enfermedad de Graves, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), enfermedades inflamatorias autoinmunitarias (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus insulino dependiente, uveorretinitis autoinmunitaria, tirotoxicosis, esclerodermia, lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis regional, ileítis distal, enteritis granulomatosa, ileítis regional, ileítis terminal), enfermedad tiroidea autoinmunitaria, anemia perniciosa, rechazo de aloinjerto, diabetes mellitus, enfermedad renal inmunomediada (glomerulonefritis, nefritis tubulointersticial), enfermedades desmielinizantes de los sistemas nerviosos central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotropos),

40 hepatitis activa crónica autoinmunitaria, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerosante, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades cutáneas autoinmunitarias o inmunomediadas incluyendo enfermedades cutáneas ampollas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinófilas, fibrosis pulmonar idiopática y

45 neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas con trasplantes incluyendo rechazo de injerto y enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades infecciosas incluyendo enfermedades virales tales como SIDA (infección por VIH), herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones protozoarias, infecciones parasitarias y virus respiratorio sincitial, virus de la inmunodeficiencia humana, etc., eczema y choque endotóxico.

50

Según un aspecto adicional la invención proporciona un péptido que puede tratar, prevenir o mejorar la inflamación con la secuencia de SEQ ID NO: 19.

Según un aspecto adicional la invención proporciona un péptido que puede tratar, prevenir o mejorar el choque endotóxico con la secuencia de SEQ ID NO: 19.

- 5 Según un aspecto adicional la invención proporciona un péptido que puede reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios con la secuencia de SEQ ID NO: 19.

Según otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido con la secuencia de SEQ ID NO: 19.

- 10 La composición farmacéutica puede ser para el tratamiento y/o la prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico, y/o para la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas.

Según un aspecto adicional la invención proporciona un péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19.

- 15 Según un aspecto adicional la invención proporciona un péptido que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, el 90% o el 95% con un péptido que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19, tal como se define en la reivindicación 1.

Según un aspecto adicional la invención proporciona el uso de uno o más péptidos tal como se definen en la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una herida.

- 20 La invención permite un método de tratamiento, prevención o mejora de una herida en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos derivados del extremo C-terminal de una proteína quemerina, tal como se define en las reivindicaciones.

Según un aspecto adicional la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos tal como se definen en la reivindicación 1, para el tratamiento de una herida.

- 25 Según un aspecto adicional la invención proporciona uno o más péptidos tal como se definen en la reivindicación 1, o la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico, y/o para la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas.

Según un aspecto adicional la invención proporciona uno o más péptidos tal como se definen en la reivindicación 1 o la reivindicación 10 para su uso en el tratamiento de una herida.

- 30 Figuras 1A-F - figuras 1A y 1B ilustran que quemerina140 suprime la producción de mediadores inflamatorios por macrófagos de un modo dependiente de proteólisis. Se sometieron a ensayo sobrenadantes de macrófagos o macrófagos activados (tratados con LPS 100 ng/ml e interferón gamma 20 ng/ml) para determinar la expresión de citocinas usando ensayos Luminex y ELISA. Se incubaron células en presencia o ausencia de quemerina murina recombinante o dexametasona a las dosis indicadas y en ausencia o presencia del inhibidor de proteasas leupeptina (15 mg/ml). Figura 1C – Se cuantificaron los niveles de ARNm de citocinas de macrófagos mediante qRT-PCR (IL-10, TGFβ) y se normalizaron para HPRT. Figura 1D – Se pretrataron PMΦ con quemerina (0,1 - 1 pM) ± toxina pertúsica (PTX; 200 ng/ml) antes de la exposición a LPS/IFNγ. Figura 1E – Se pretrataron PMΦ con quemerina (1 pM) durante 1 h ± PTX y entonces se estimularon con LPS/IFNγ durante 4 h, 8 h o 15 h. \*\*\*, p < 0,001; \*\*, p < 0,01; \*, p < 0,05 con respecto a muestras tratadas con LPS/IFNγ. ###, p < 0,001; ##, p < 0,01; #, p < 0,05 con respecto a muestras tratadas con quemerina. Figura 1F – Se pretrataron macrófagos peritoneales (PMΦ) con quemerina (1 pM), quemerina (1 pM) + inhibidor de proteasas (leupeptina [Leu], E-64, Pefabloc [Pef], pepstatina A [Pep A], calpeptina [Cal], inhibidor de catepsina S [Cath S], inhibidor de catepsina L [Cath L]) durante 1 h y entonces se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFNγ (20 ng/ml) durante 15 h. Las gráficas muestran valores medios ± EEM a partir de 3-8 experimentos independientes. nd; por debajo del límite de detección para este ensayo. ns, no significativo;

- 45 Figura 2A - muestra la alienación de secuencias de aminoácidos de quemerina (Tig2) humana (secuencia superior) y de ratón (secuencia inferior). Se alinearon secuencias de aminoácidos para quemerina humana (n.º de registro de Protein Data Bank NP\_002880) y murina (NP\_082128) y se analizaron usando PeptideCutter (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) para generar sitios de escisión por tripsina predichos (líneas verticales negras). La secuencia de longitud completa en negrita y gris es la secuencia de preproquemerina (SEQ ID NO: 33 para ser humano y SEQ ID NO: 36 para ratón). La secuencia con los aminoácidos N-terminales en gris eliminados

es la secuencia de proquemerina (SEQ ID NO: 32 para ser humano y SEQ ID NO: 35 para ratón). La secuencia en negrita, con los aminoácidos N-terminales y C-terminales en gris eliminados es la secuencia de quemerina (SEQ ID NO: 31 para ser humano y SEQ ID NO: 34 para ratón). También se facilitan las secuencias para los péptidos C-terminales C11m (SEQ ID NO: 1), C13m (SEQ ID NO: 2), C15m (SEQ ID NO: 3) y C17m (SEQ ID NO: 4);

5 Figura 2B - ilustra que péptidos derivados a partir de la parte C-terminal de quemerina suprimen la producción de mediadores proinflamatorios por macrófagos activados. La referencia en esta figura a los péptidos C13, C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C13m, C15m y C17m, respectivamente;

Figura 3 - ilustra que los péptidos de quemerina presentan escasas propiedades quimiotácticas de macrófagos en comparación con quemerina140. La referencia en esta figura a los péptidos C11, C13, C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C11m, C13m, C15m y C17m, respectivamente;

Figuras 4A-H - muestran la quimiotaxis mediada por quemerina, péptidos de quemerina y sobrenadantes tratados con quemerina. Se permitió que PM $\Phi$  ( $0,4 \times 10^6$ ) con o sin pretratamiento con toxina pertúsica de 30 min (PTX; 200 ng/ml) migraran hacia el quimioatrayente (figura 4A; rmquemerina, figura 4B; C15, figura 4C; C11, figura 4D; C13, figura 4E; C19, figura 4F; C6, figura 4G; C8) en el pocillo inferior de una cámara Boyden modificada a lo largo de 4 h. Figura 4H - Se permitió que PM $\Phi$  ( $7,5 \times 10^5$ ) migraran hacia medios condicionados a partir de macrófagos no tratados y macrófagos tratados con LPS/IFN $\gamma$   $\pm$  quemerina o C15 en el pocillo inferior de una cámara Boyden modificada a lo largo de 4 h. Las gráficas indican índice de migración media  $\pm$  EEM para cada grupo de tratamiento (n=4 experimentos independientes). \*\*\*, P < 0,001; \*\*, P < 0,01; \*, P < 0,05 con respecto a PM $\Phi$  + PTX (prueba de la t de Student). La referencia en esta figura a los péptidos C11, C13, C15 y C19 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C11m, C13m, C15m y C19m, respectivamente;

Figura 5 - ilustra que los macrófagos presentan quimiotaxis reducida hacia medios condicionados a partir de macrófagos tratados con quemerina. La referencia en esta figura a los péptidos C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C15m y C17m, respectivamente;

Figura 6 - ilustra que quemerina15-ratón suprime la peritonitis inducida por zimosano. La referencia en esta figura al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m. Z se refiere a zimosano;

Figuras 7A-G - muestran que quemerina15 mejora la peritonitis inducida por zimosano en ratones. Figuras 7A y 7B - se dosificó por vía i.p. a ratones C57B16/J con PBS o quemerina15 (0,32 ng/kg) seguido por inyección con PBS o zimosano (10 mg,  $\sim 2 \times 10^6$  partículas por cavidad) 1 h más tarde. Se recogieron células de exudado peritoneal mediante lavado peritoneal en múltiples puntos de tiempo (figura 7A y 7B; 5-6 ratones/tratamiento) o tras 4 h (figuras 7C-7E; 6-15 ratones/grupo). Figuras 7C-7E - se cuantificó el número de células totales en el líquido de lavado y se determinó la composición celular (neutrófilos frente a fagocitos mononucleares) usando análisis de FACS. Se bloquearon las células con anticuerpo 2.4G2 anti-Fc $\gamma$ R1/II/III y se tiñeron con Ly-6G-PE y 7/4-FITC. Se construyeron compuertas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4alto, Ly-6Galto) y monocitos inflamatorios (Mo; 7/4alto, Ly-6Gbajo). Figura 7E - Se muestran gráficos de FACS representativos para cada grupo de tratamiento a las 4 h después del zimosano. Figura 7F - Se sometió a ensayo el líquido de lavado peritoneal para determinar TNF $\alpha$  y KC mediante ELISA e IL-6, IL-1 $\beta$  y MCP-1 mediante ensayo Luminex. C15; quemerina15, Z; zimosano. \*\*\*, P < 0,001; \*\*, P < 0,01 \*\* con respecto a animales tratados con zimosano (prueba de la t de Student). Figura 7G - Se dosificó a ratones i.p. (6-8/tratamiento) con zimosano (10  $\mu$ g) y con C15 (8 pg) o PBS o bien 1 h antes (pretratamiento con C15) o bien 2 h después (postratamiento con C15). Se llevó a cabo el lavado peritoneal 4 h tras la exposición a zimosano. La referencia en esta figura al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figuras 8A-D - muestran que el anticuerpo anti-quemerina neutraliza especies de quemerina y agrava la inflamación peritoneal. Figura 8A - Se usaron PM $\Phi$  en ensayos de quimiotaxis de macrófagos (realizados tal como se detalla en la figura 7) y se permitió que migraran hacia RANTES, quemerina o C15 con o sin anticuerpo anti-rmquemerina o IgG control. Las gráficas indican el índice de migración media  $\pm$  EEM para cada grupo de tratamiento (n=4 experimentos independientes). \*\*\*, P < 0,001; \*\*, P < 0,01; \*, P < 0,05 con respecto a quimioatrayente. Figura 8B - Se pretrataron PM $\Phi$  con C15 1 pM o quemerina 1 pM con o sin anticuerpo anti-rmquemerina o IgG control durante 1 h y entonces se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h. Se determinó la expresión media de RANTES  $\pm$  EEM en sobrenadantes de macrófago tras 16 h mediante ELISA (n = 4 experimentos independientes). \*\*, P < 0,01; \*, P < 0,05 con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN $\gamma$ . Figuras 8C y 8D - se dosificó por vía i.p. a ratones C57B16/J con PBS, anticuerpo anti-rmquemerina (100 ng/ratón) o IgG control (100 ng/ratón) seguido por inyección con PBS o zimosano (10  $\mu$ g/cavidad) 1 h después. Se recogieron células de exudado peritoneal mediante lavado peritoneal 4 h y 24 h tras la inyección de zimosano y se procesaron tal como se explicó resumidamente en la figura 7. Z; zimosano, ChAB; anticuerpo anti-rmquemerina. \*\*, P < 0,01 con respecto a ratones expuestos a zimosano. La referencia en esta figura al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figura 9 - ilustra que la inyección de C15m 0,32 ng/kg solo no induce el reclutamiento de neutrófilos o macrófagos

pero reduce los niveles de TNF $\alpha$  peritoneales. La referencia en esta figura al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

5 Figura 10 - ilustra que un péptido de quemerina13-humana modificado suprime la expresión de transcrito de RANTES y TNF $\alpha$  en macrófagos murinos. La referencia en esta figura al péptido hC13 se refiere al péptido C13h modificado;

Figura 11 - ilustra que C17m no afecta a la quimiotaxis de macrófagos inducida por C140. La referencia en esta figura al péptido C17 se refiere al péptido descrito anteriormente C17m;

10 Figura 12 - ilustra que la quemerina15-ratón y quemerina17-ratón suprimen la secreción de TNF $\alpha$  por macrófagos murinos estimulados con zimosano. La referencia en esta figura a los péptidos C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C15m y C17m, respectivamente. Dexa se refiere a dexametasona;

Figura 13 – es un análisis en damero que demuestra que quemerina140 y quemerina15-ratón inducen una quimiotaxis de macrófagos verdadera y no quimioquinesis. La referencia en esta figura al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

15 Figuras 14A-B - muestran que quemerina15 suprime el reclutamiento de monocitos y neutrófilos en peritonitis por zimosano a lo largo de un intervalo de dosis de C15 y zimosano. Figura 14A – se dosificó por vía i.p. a ratones C57B16/J (5-6 animales/tratamiento) con PBS o C15 (0,32 ng/kg) seguido por inyección con PBS o intervalo de dosis de zimosano (10  $\mu$ g – 1 mg; A) 1 h más tarde. Figura 14B – se dosificó por vía i.p. a ratones (5-6 animales/tratamiento) con PBS o intervalo de dosis de C15 (4-40 pg/ratón) seguido por inyección con PBS o zimosano (10  $\mu$ g;  $2 \times 10^6$  partículas/cavidad) 1 h más tarde. Se recogieron células de exudado peritoneal mediante lavado peritoneal 4 h tras la exposición a zimosano; 5-6 ratones/grupo). Se cuantificó el número de células totales en el líquido de lavado y se determinó la composición celular (neutrófilos frente a fagocitos mononucleares) usando análisis de FACS tal como se describe en la figura 7. C15; quemerina15 Z; zimosano. \*\*\*, P < 0,001; \*\*, P < 0,01 \*\*; P < 0,05 \* con respecto a animales tratados con zimosano (prueba de la t de Student). La referencia en esta figura al péptido C15 o quemerina15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m; y

25 Figura 15 - muestra la fluorimetría para el reconocimiento de zimosano por macrófagos expresado como índice de reconocimiento relativo. Se realizaron experimentos en presencia o ausencia de diversas concentraciones de C15. Los datos representan la media ( $\pm$  e.e.m.) de cuatro experimentos combinados, normalizados.

La referencia en el presente documento a quemerina140 o C140 hace referencia a la proteína quemerina de ratón de 140 aminoácidos (quemerina-140-ratón) de secuencia ID n.º: 34.

### 30 Ejemplos

Quemerina140 ejerce efectos antiinflamatorios sobre macrófagos activados que se suprimen por inhibidores de proteasas

35 Estudios anteriores han demostrado que serina proteasas liberadas por células polimorfonucleares (PMN) tras la desgranulación escinden el extremo C-terminal de proquemerina y liberan su potencial quimiotáctico (Wittamer V *et al.* J Immunol. 1 de julio de 2005; 175(1):487-493). Sin embargo, en el presente documento se da a conocer el efecto antiinflamatorio de péptidos producidos por procesamiento proteolítico adicional de quemerina.

40 Se cultivaron macrófagos peritoneales murinos (PM $\theta$ , también denominados PM $\Phi$  en el presente documento) en diversas condiciones: no tratados; LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h; pretratamiento con quemerina (1 pM) durante 1 h luego LPS/IFN $\gamma$  durante 15 h; leupeptina (inhibidor de proteasas; 15 mg/ml) y quemerina (1 pM) durante 1 h luego LPS/IFN $\gamma$  durante 15 h; o dexametasona (control positivo; pretratamiento 1  $\mu$ M) durante 1 h luego LPS/IFN $\gamma$  durante 15 h.

45 Se analizaron sobrenadantes de los macrófagos tratados con quemerina + lipopolisacárido/interferón- $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ ) para determinar el contenido en quimiocinas y los resultados mostraron que las células tratadas con quemerina presentaron niveles significativamente inferiores de TNF $\alpha$  (70%), IL-12 p40 (54%), RANTES (CCL5; 40%), IL-6 (42%) e IL-1 $\beta$  (60%) en comparación con muestras tratadas con LPS/IFN $\gamma$  (n=5; p < 0,001 figura 1A y 1B). Este efecto antiinflamatorio se inhibió mediante inhibidores de proteasas de amplio espectro (leupeptina), que cuando se añadieron a los macrófagos impidieron cualquier efecto antiinflamatorio, lo que ilustra la importancia de la escisión de quemerina adicional en la producción de estos péptidos antiinflamatorios (figura 1A y figura 1F).

50 Se demostró además que estos efectos eran específicos para la quemerina usando un anticuerpo neutralizante anti-quemerina; que eliminó el efecto antiinflamatorio de la quemerina (figura 8B).

Las gráficas de barras en la figura 1A muestran la expresión media de citocinas tal como se determinó mediante el ensayo Luminex  $\pm$  EEM. Se realizaron experimentos con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes empleando células de diferentes grupos de ratones C57B16/J.  $p < 0,001$  \*\*\*;  $p < 0,01$  \*\* con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN $\gamma$  a menos que se indique lo contrario. Dexam se refiere a dexametasona (1 mM).

La figura 1B muestra resultados similares tal como se comentó anteriormente en relación con la figura 1A, con datos adicionales que muestran los efectos de quemerina a diferentes concentraciones de 0,1 pM, 0,5 pM y 1,0 pM.

Además, la figura 1C muestra que la quemerina indujo la expresión de ARNm para las citocinas antiinflamatorias TGF $\beta$  (54%) e IL-10 (89%).

Los efectos de la quemerina eran dependientes de la dosis observándose respuestas máximas a 1 pM (figura 1B y figura 1C), y eran sensibles a la toxina pertúsica, indicando la implicación de un GPCR unido a G $\alpha$ i (figura 1D).

Además, se observaron efectos antiinflamatorios 4 h, 8 h y 15 h tras la administración de LPS/IFN $\gamma$  y se suprimieron mediante PTX en todos los puntos de tiempo (figura 1E).

Estudios anteriores han demostrado que serina proteasas liberadas por granulocitos tras desgranulación escinden el extremo C-terminal de proquemerina y liberan su potencial quimiotáctico (Wittamer, V., *et al.*, (2005), *J Immunol* 175:487-493). Se investigó la posibilidad de que quemerina murina pueda experimentar procesamiento proteolítico adicional mediante enzimas liberadas tras la activación de M $\Phi$  murinos. Tal como se comentó anteriormente en relación con la figura 1A, la coadministración de quemerina con leupeptina (un inhibidor de serina y cisteína proteasa) abolió sus efectos antiinflamatorios (figura 1A y figura 1F). Este efecto también se demostró para E-64 (un inhibidor de cisteína proteasa), mientras que el inhibidor de proteasa ácida pepstatina A y el inhibidor de serina proteasa Pefabloc no ejercieron ningún efecto sobre la supresión mediada por quemerina de la activación de M $\Phi$  (figura 1F). Estos datos demuestran que la quemerina ejerce efectos inhibidores sobre la activación de M $\Phi$  de una manera dependiente de cisteína proteasa. Se usaron un inhibidor de catepsina L (Z-FF-FMK), inhibidor de catepsina S (Z-FL-COCHO) y un inhibidor de calpaína I y II, calpeptina, para estudiar con sonda adicionalmente las cisteína proteasas específicas implicadas en la escisión de quemerina (figura 1F). Se encontró que los efectos antiinflamatorios de quemerina eran dependientes de calpaínas y catepsina S pero eran independientes de catepsina L. Tomados en conjunto los resultados demuestran por primera vez que los M $\Phi$  murinos activados de manera clásica pueden convertir quemerina en inhibidores peptídicos potentes de la activación de M $\Phi$  mediante escisión mediada por cisteína proteasa específica de la molécula original, lo más probablemente implicando a calpaína II y catepsina S.

#### Péptidos C-terminales de quemerina con actividad antiinflamatoria

Se diseñó una serie de péptidos de 11-20 aa usando funciones de alineación de secuencias en Ensembl como indicador de residuos conservados importantes y se denominaron C11m (P144-A154; PHGYFLPGQFA SEQ ID NO: 1), C13m (P144-S156; PHGYFLPGQFAFS SEQ ID NO: 3), C15m (A140-A154; AGEDPHGYFLPGQFA SEQ ID NO: 4) y C17m (A140-S156; AGEDPHGYFLPGQFAFS SEQ ID NO: 6) C19 (A138-S156; AQAGEDPHGYFLPGQFAFS SEQ ID NO: 37), N19 (E23-K41; ELSETQRRSLQVALEEFHK SEQ ID NO: 44) y M20 (K86-K105; KPECTIKPNRRRKCLACIK SEQ ID NO: 45). La figura 2A muestra una alineación de secuencias para algunos de estos péptidos. Se caracterizaron péptidos de quemerina (1 pM - 100 nM) en el ensayo de activación de macrófagos según el protocolo descrito.

Se cultivaron PM $\theta$  murinos en diversas condiciones: no tratados, LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h; pretratamiento con péptidos de quemerina (a una concentración de 1 pM-100 nM) durante 1 h luego LPS/IFN $\gamma$  durante 15 h. Las concentraciones presentadas representan las dosis eficaces óptimas para cada péptido en ambos ensayos. Las gráficas de barras en la figura 2B presentan la expresión media de proteína RANTES y TNF $\alpha$   $\pm$  EEM. Se realizaron experimentos con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. Se muestran datos representativos a partir de cinco experimentos independientes empleando células de diferentes grupos de ratones C57B16/J.  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,001$  \*\*\* con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN $\gamma$ .

Los péptidos C-terminales C13m (100 pM), C15m (1 pM) y C17m (1 pM) suprimieron la secreción de RANTES (C13m - 32%; C15m - 41%; C17m - 49%) y la expresión de TNF $\alpha$  (C13m - 10%; C15m - 56%; C17m - 66%, figura 2B) inducida por LPS/IFN $\gamma$ . C15m y C17m inhibieron la activación de macrófagos hasta un grado similar a C140 cuando se usaron en la misma concentración.

En la tabla 1 se muestran resultados similares, en los que los péptidos C-terminales C13 y C19 suprimieron moderadamente la expresión de RANTES y TNF $\alpha$  inducida por LPS/IFN $\gamma$  con una dosis óptima de 100 pM (tabla 1). Sin embargo, quemerina<sub>15</sub> (C15) conservó la actividad antiinflamatoria mostrada por quemerina proteolisada e

5 inhibió la expresión de citocina con eficacia y potencia similares a quemerina (dosis óptima de 1 pM). Además, C11, el péptido N-terminal (N19), péptido intermedio (M20) y los péptidos control (C15 desordenado (*scrambled*); C15-S, GLFHDQAGPPAGYEF; SEQ ID NO: 39 y C15 mutante; C15-M, AGEDPHGYALPGQAA; SEQ ID NO: 40) carecían de actividad antiinflamatoria en el ensayo de activación de MΦ. También se encontró que los péptidos de 6 aa (RALRTK; SEQ ID NO: 41) y 8 aa (FSRALRTK; SEQ ID NO: 42) eliminados durante la escisión de proquemerina por proteasas de las cascadas de coagulación y fibrinolítica, denominados C6 y C8, respectivamente, no presentaban actividad antiinflamatoria detectable en ensayo de activación de MΦ.

Tabla 1

Porcentaje de inhibición de la expresión de citocinas inflamatorias inducida por LPS/IFN $\gamma$											
Citocina	Quemerina	C6	C8	C11	C13	C15	C15-S	C15-M	C19	N19	M20
TNF $\alpha$	70	0	0	0	10	61	0	0	21	0	0
RANTES	40	0	0	0	32	47	0	0	41	0	0
IL-1 $\beta$	60	-	-	-	-	54	-	-	-	-	-
IL-12 p40	54	-	-	-	-	47	-	-	-	-	-
IL-6	42	-	-	-	-	43	-	-	-	-	-

10 Con referencia a la tabla 1, actividad antiinflamatoria de péptidos derivados de quemerina, se cultivaron PM $\Phi$  murinos tal como se describe para la figura 1B y se expusieron a LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h con/sin pretratamiento con péptidos (0,1 pM-100 nM) durante 1 h. Cuando los péptidos presentaron propiedades antiinflamatorias, el porcentaje de inhibición de la activación de macrófagos inducida por LPS/IFN $\gamma$  representa el efecto con la dosis óptima (quemerina y C15 1 pM o C13 y C19 100 pM). Las secuencias peptídicas son: C11 (P144-A154; PHGYFLPGQFA), C13 (P144-S156; PHGYFLPGQFAFS), C15 (A140-A154; AGEDPHGYFLPGQFA), C19 (A138-S156; AQAGEDPHGYFLPGQFAFS; SEQ ID NO. 37), N19 (E23-K41; ELSETQRRSLQVALEEFHK SEQ ID NO: 44) y M20 (K86-K105; KPECTIKPNRRRKCLACIK SEQ ID NO. 45). Péptidos control: C15 desordenado (C15-S; GLFHDQAGPPAGYEF) y C15 mutante (C15-M; AGEDPHGYALPGQAA; F148A y F153A). Los datos representan el porcentaje de inhibición media de la producción de citocinas por macrófagos activados de manera clásica a partir de 4-8 experimentos independientes tal como se determinaron mediante ensayo ELISA y Luminex.

20 Quemerina140, pero no sus péptidos antiinflamatorios derivados C-terminales, es un potente quimioatrayente de macrófagos

25 Se utilizaron ensayos en la cámara Boyden modificada para demostrar las propiedades quimioatrayentes de macrófagos de C140. La quemerina140 de ratón presenta una curva con forma de campana típica observándose una quimiotaxis óptima a 10 nM, disminuyendo después de eso, supuestamente tras la desensibilización del receptor o la descomposición del gradiente de quimioatrayente (figura 3). Esto también se muestra en la figura 4A, con datos adicionales que muestran los efectos del pretratamiento con toxina pertúsica (PTX: 200 ng/ml).

30 Se permitió que PM $\Phi$  ( $0,5 \times 10^6$ ) migraran hacia el quimioatrayente (quemerina140 o péptidos de quemerina) en el pocillo inferior de una cámara Boyden modificada a lo largo de 4 h. Se fijaron los filtros en formalina al 4%, entonces se tiñeron los núcleos de las células que habían migrado con DAPI y se visualizaron. Se usaron medios libres de suero (SFM) como control negativo y el quimioatrayente de macrófagos RANTES (25 ng/ml; 3 nM) como control positivo. Las gráficas indican el índice de migración media (% de área umbral de quimioatrayente/% de área umbral de SFM)  $\pm$  EEM para cada grupo de tratamiento (n = 5-6). p < 0,001 \*\*\*; p < 0,01 \*\*; p < 0,05 \* con respecto a pocillos tratados con SFM.

35 Se observó que C11m, C13m y C15m (1 pM - 100 nM) presentaban escasa actividad quimiotáctica en comparación con C140 (1 pM - 50 nM) o el control positivo, RANTES de quimioquina CC (25 ng/ml; 3 nM). Se observó migración de macrófagos máxima en C15m 100 pM y C13m y C11m 10 nM. Sin embargo, C17m no presentó actividad quimiotáctica en todas las concentraciones sometidas a prueba (0,1 pM - 500 nM; n = 5 experimentos independientes; figura 3). Este resultado también se muestra en las figuras 4B-D, con datos adicionales que muestran los efectos del pretratamiento con toxina pertúsica (PTX: 200 ng/ml). Con referencia a la figura 4E, C19 tampoco presentó actividad quimiotáctica en todas las concentraciones sometidas a prueba (0,1 pM - 500 nM; figura 4E). Por tanto se ha identificado un péptido derivado de quemerina que conserva actividad antiinflamatoria pero no

presenta actividad quimiotáctica para MΦ, lo que indica la existencia de distintos componentes de quemerina específicos para la función que podrían aprovecharse terapéuticamente. Los péptidos derivados de proquemerina, C6 y C8, que se encontró que carecían de la actividad antiinflamatoria de MΦ, tampoco podían inducir migración de MΦ en todas las concentraciones sometidas a pruebas (0,1 pM - 500 nM; figura 4F-G). Por tanto los datos parecen indicar que la especie quimiotáctica principal es o bien la propia molécula de quemerina escindida, o bien un péptido aún no identificado.

Ejemplo adicional que muestra que quemerina y quemerina15 inducen la supresión generalizada de la producción de quimioatrayente por macrófagos

Dado el papel bien establecido de quimioatrayentes derivados de MΦ en el reclutamiento de células inmunitarias durante la inflamación (Glabinski, A.R., *et al.*, (1998). *Neuroimmunomodulation* 5:166-171; Huang, D. J. *et al.*, (2001). *J. Exp. Med.* 193:713-726), se usó medio condicionado de MΦ no tratados y MΦ tratados con quemerina+LPS/IFN $\gamma$ , C15+LPS/IFN $\gamma$  y LPS/IFN $\gamma$  solos en ensayos de quimiotaxis para evaluar cómo podía afectar la supresión de la activación de MΦ por quemerina y el péptido C-terminal sintético, C15 al reclutamiento de MΦ adicional (véase la figura 4H). El propio medio condicionado con MΦ no tratados no presentó actividad quimiotáctica para MΦ (índice de migración  $1,0 \pm 0,15$ ); sin embargo, el medio de macrófagos tratados con LPS/IFN $\gamma$  indujo un aumento marcado de la quimiotaxis de MΦ (índice de migración  $9,3 \pm 0,4$ ; figura 4H). Además, MΦ presentaron una reducción de la quimiotaxis hacia medios condicionados a partir de macrófagos tratados con quemerina + LPS/IFN $\gamma$  y C15 + LPS/IFN $\gamma$  en un 49% y un 55%, respectivamente (figura 4H). Esto indica que quemerina y C15 inducen la supresión general de una amplia gama de quimioatrayentes de MΦ derivados de MΦ hasta el grado de que la actividad quimiotáctica de los medios condicionados se ve afectada.

Ensayos de quimiotaxis secundarios adicionales revelaron quimiotaxis de macrófagos suprimida hacia sobrenadantes de macrófagos tratados con quemerina140-ratón, quemerina15 ratón y quemerina17-ratón. Estos resultados muestran que el pretratamiento de macrófagos activados con C15m y C17m disminuye la cantidad y/o la bioactividad de quimioatrayentes liberados por macrófagos, y por tanto estos péptidos pueden reducir significativamente el reclutamiento de monocitos/macrófagos continuado a sitios de inflamación.

Se usaron medios condicionados de macrófagos tratados con C140 + LPS/IFN $\gamma$ , C15m + LPS/IFN $\gamma$ , C17m+LPS/IFN $\gamma$  y LPS/IFN $\gamma$  solos en ensayos de quimiotaxis secundarios para evaluar las posibles repercusiones fisiopatológicas asociadas con la supresión de la activación de macrófagos por C140 y sus péptidos C-terminales.

Se permitió que células ( $0,5 \times 10^6$ ) migraran hacia medios condicionados o quimioatrayente (péptidos de quemerina) en el pocillo inferior de una cámara Boyden modificada a lo largo de 4 h. Se usaron medios libres de suero (SFM) como control negativo. Se fijaron los filtros en formalina al 4%, entonces se tiñeron los núcleos con DAPI y se visualizaron. Las gráficas de barras indican el índice de migración media (% de área umbral de quimioatrayente/% de área umbral de SFM)  $\pm$  EEM para cada grupo de tratamiento. Cada barra representa pocillos al menos por triplicado y 6 imágenes tomadas por tratamiento. La significación  $p < 0,001$  \*\*\*;  $p < 0,01$  \*\* es con respecto a medios condicionados con LPS/IFN $\gamma$  a menos que se indique lo contrario. AB se refiere a anticuerpo anti-quemerina murina.

Tal como puede observarse a partir de los resultados presentados en la figura 5 el propio medio condicionado de macrófagos no presentó actividad quimiotáctica para macrófagos, sin embargo, medio de macrófagos tratados con LPS/IFN $\gamma$  indujo un aumento drástico en la quimiotaxis de macrófagos. Además, los macrófagos presentaron una reducción de la quimiotaxis hacia medios condicionados de macrófagos tratados con C140 + LPS/IFN $\gamma$ , C15m + LPS/IFN $\gamma$  y C17m + LPS/IFN $\gamma$ , lo que indica la capacidad de C140, C15m y C17m para inducir la supresión general de una amplia gama de quimioatrayentes de macrófagos.

Para excluir la posibilidad de que los sobrenadantes tratados con quemerina albergaran proteínas/péptidos quimiotácticos derivados de quemerina, se incubaron los sobrenadantes con un anticuerpo neutralizante frente a quemerina antes de la evaluación de la migración de macrófagos. No parecía que la quemerina contribuyese a la migración en sobrenadantes tratados con quemerina.

Quemerina15-ratón suprime la peritonitis inducida por zimosano

Puede inducirse inflamación peritoneal mediante inyección intraperitoneal de partículas de zimosano (un componente de la pared celular de levaduras) que provoca una respuesta inflamatoria aguda. La peritonitis inducida por zimosano sigue una acumulación dependiente del tiempo bien descrita de neutrófilos, luego monocitos en cavidades peritoneales de ratón (para revisión véase Lawrence T *et al.* *Nat Rev Immunol.* Octubre de 2002; 2(10):787-795). Se ha utilizado este modelo para demostrar las propiedades de pro-resolución de mediadores establecidos, lipoxina A4 y anexina-1, que normalmente acortan el transcurso de tiempo de la inflamación con una restauración más temprana de la estructura y función tisulares y una supresión de la extravasación de neutrófilos y monocitos. Experimentos previos indicados en la bibliografía han usado un intervalo de dosis de partículas de

zimosano A (10  $\mu\text{g}$  - 1 mg) (Tailor PR *et al.* Eur J Immunol. 2005; 35(7):2163-2174; Arita M *et al.* J. Biol. Chem. 11 de agosto de 2006; 281(32):22847-22854).

Dado el alto potencial quimiotáctico de quemerina y el requisito inherente de proteólisis, se usó el péptido sintético C-terminal quemerina15 para la caracterización *in vivo* de los efectos antiinflamatorios en el modelo de peritonitis estéril, puesto que C15 carece en gran parte de actividad quimiotáctica (figura 3 y figura 4B) aún ejerce efectos antiinflamatorios que son comparables a los de quemerina proteolisada (tabla 1).

Con referencia a los resultados mostrados en la figura 6, este estudio usó 10  $\mu\text{g}$  por ratón (1-2 partículas por macrófago residente) ya que se cree que esto representa lo más estrechamente una dosis fisiopatológica.

Más específicamente, se inyectó por vía intraperitoneal a ratones C57B16/J macho (8-12 semanas) 0,5 ml de PBS o 0,5 ml de quemerina15-ratón (0,32 ng/kg) seguido por inyección con 0,5 ml de PBS o zimosano ( $2 \times 10^6$  partículas por cavidad) una hora más tarde. Tras 4 horas se sacrificaron los animales y se lavaron las cavidades peritoneales con 5 ml de PBS-EDTA 3 mM. Se obtuvieron recuentos de células totales usando la prueba de exclusión de azul tripano. Para la determinación de la composición celular (neutrófilos frente a fagocitos mononucleares), se bloquearon células con AcM 2.4G2 anti-Fc $\gamma$ RII/III durante 5 min y se tiñeron con AcM anti-Ly-6G de ratón conjugado con PE y AcM anti-7/4 de ratón conjugado con FITC durante 10 min. Se fijaron las células en formaldehído al 1% antes del análisis de FACS con el software CellQuest. Se construyeron compuertas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>alto</sup>) y monocitos inflamatorios (Mo; 7/4<sup>alto</sup>). C15 se refiere a quemerina15-ratón. Z se refiere a zimosano.  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,05$  \* con respecto a tratados con zimosano.

Se determinaron las poblaciones de neutrófilos (7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>alto</sup>), monocitos (7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>bajo</sup>) y macrófagos residentes (7/4<sup>bajo</sup>, Ly-6G<sup>bajo</sup>) según Gordon S y Tailor PR Nat Rev Immunol. 2005; 5(12):953; Tailor PR *et al.* Eur J Immunol. Agosto de 2003; 33(8):2090-2097; y Tailor PR *et al.* Eur J Immunol. Julio de 2005; 35 (7) : 2163-2174.

El resultado de este estudio muestra que los ratones tratados con C15m a una dosis de 0,32 ng/kg (8 pg/ratón) presentaron una reducción del reclutamiento de monocitos y neutrófilos provocado por zimosano del 42% y del 52%, respectivamente (figura 6). También se redujeron los niveles de TNF $\alpha$  en ratones tratados con C15m.

Se investigó adicionalmente el resultado anterior. Para determinar las propiedades antiinflamatorias del péptido C15 *in vivo* se realizó un experimento de transcurso temporal que se extendía a lo largo de 48 h. Se determinaron las poblaciones de neutrófilos (7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>alto</sup>) y monocitos (7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>bajo</sup>) en líquido de lavado peritoneal mediante análisis de FACS según protocolos publicados (Tailor, P.R. *et al.*, (2005). Eur J Immunol 35:2163-2174; Tailor, P.R., (2003). Eur J Immunol 33:2090-2097). La administración de zimosano en la cavidad peritoneal de ratón produjo una extravasación dependiente del tiempo de células inflamatorias en la cavidad peritoneal, que seguía el perfil típico de una respuesta inflamatoria aguda (figura 7A-B, línea continua). Los neutrófilos fueron los primeros leucocitos en infiltrarse en la cavidad, detectables a las 2 h tras el zimosano produciéndose neutrofilia máxima a las 4 h ( $1,95 \times 10^6$  células). El flujo de entrada de monocitos en la cavidad peritoneal inflamada fue detectable por primera vez tras 4 h ( $0,69 \times 10^6$  células), alcanzando un máximo a las 24 h tras la inyección de zimosano ( $1,25 \times 10^6$  células) y disminuyendo después de eso. El pretratamiento con C15 a una dosis de 8 pg/ratón ( $\approx 0,32$  ng/kg) 1 h antes de la exposición a zimosano llevó la neutrofilia máxima a las 2 h con aproximadamente el 50% de la magnitud de la de ratones expuestos a zimosano (se redujo desde  $1,25 \times 10^6$  hasta  $0,62 \times 10^6$  células; figura 7A, línea discontinua). Se observó una supresión significativa de la infiltración de neutrófilos mediante C15 a las 2 h, (50%), 4 h (66%) y 24 h (50%). Una única dosis de 8 pg de péptido C15 también fue eficaz en la reducción del número de monocitos peritoneales en cavidades inflamadas en todos los puntos de tiempo, observándose una supresión de más del 60% a las 4 h (63%), 8 h (61%) y 48 h (64%; figura 7B, línea discontinua). La tasa de infiltración de monocitos fue la más alta a las 2-4 h tras la inyección de zimosano ( $0,51 \times 10^6/h$ ) y la administración de C15 redujo la velocidad de flujo de entrada en la cavidad inflamada ( $0,18 \times 10^6/h$ ). Por tanto, una única dosis de péptido C15 antes de la exposición a zimosano proporcionó protección significativa frente a la inflamación peritoneal inducida por zimosano a lo largo de las 48 h de duración del experimento.

El experimento de transcurso temporal identificó el punto de tiempo de 4 h tras zimosano como un punto apropiado para la validación de la actividad antiinflamatoria de C15. En este estudio una única dosis de C15 produjo una reducción dependiente de la dosis en el reclutamiento de neutrófilos y monocitos provocado por zimosano que era máxima a 8 pg/ratón de C15 ( $\approx 0,32$  ng/kg; figura 7C-E y 16AB), aunque se observaron efectos antiinflamatorios significativos con una dosis tan baja como 4 pg/ratón ( $\approx 0,16$  ng/kg; figura 14B). Cuando se administró C15 1 h antes de la exposición a zimosano, se redujo el número de neutrófilos desde  $1,9 \times 10^6$  hasta  $0,78 \times 10^6$  (disminución del 63%; figura 7C) y los niveles de monocitos desde  $0,69 \times 10^6$  hasta  $0,30 \times 10^6$  (disminución del 62%; figura 7D, se muestran gráficas de FACS representativas en el punto de tiempo de 4 h en la figura 7E). La administración de C15 también disminuyó notablemente la expresión de citocinas proinflamatorias en líquido de lavado peritoneal a las 4 h, incluyendo TNF $\alpha$  (51%), IL-1 $\beta$  (67%), IL-6 (67%), MCP-1 (59%) y KC (38%; figura 7F). También se encontró que los péptidos control C15-S y C15-M que carecían de actividad antiinflamatoria *in vitro* (tabla 1) no eran protectores cuando se administran *in vivo* a la misma dosis y tiempo que C15 tal como se evalúa por los niveles de monocitos y

neutrófilos (figura 7C-D). Todavía se observó una supresión significativa del reclutamiento de monocitos (de  $0,69 \times 10^6$  a  $0,42 \times 10^6$  células; disminución del 42%) y neutrófilos (de  $1,9 \times 10^6$  a  $0,83 \times 10^6$  células; disminución del 60%) 4 h tras zimosano cuando se administró la misma dosis de C15 2 h tras la inyección de zimosano (figura 7G). Esto demuestra que C15 puede reducir el reclutamiento de neutrófilos y monocitos en un entorno inflamatorio ya establecido, proporcionando otra indicación de que C15/derivados de C15 pueden representar farmacóforos atractivos dirigidos contra patologías inflamatorias.

El bloqueo de especies de quemerina endógena agrava la inflamación peritoneal

Se investigó un posible papel endógeno para quemerina y péptidos derivados de quemerina inyectando por vía i.p. a ratones un anticuerpo policlonal anti-quemerina (ChAc) neutralizante o una IgG control 1 h antes de una exposición a zimosano de 4 h o 24 h. Anteriormente se encontró que ChAc pero no IgG control podía inhibir la quimiotaxis de M $\Phi$  y los efectos antiinflamatorios *in vitro* inducidos por C15 y quemerina (figura 8A-B). *In vivo*, se encontró que la neutralización de especies de quemerina endógena daba como resultado un aumento del 63% del número de neutrófilos peritoneales y un aumento del 45% de los niveles de monocitos en el punto de tiempo de 4 h con respecto a ratones tratados con IgG control y un aumento del 170% y del 86% de los niveles de neutrófilos y monocitos peritoneales 24 h tras la inyección de zimosano (figura 8C-D). Este agravamiento de la inflamación peritoneal a lo largo de un periodo de 24 h sugiere un papel antiinflamatorio endógeno importante de la especie de quemerina *in vivo*.

Quemerina15-ratón sola no induce el reclutamiento de neutrófilos o macrófagos pero reduce los niveles de TNF $\alpha$

Se inyectó por vía intraperitoneal a ratones C57B16/J macho (8-12 semanas) 0,5 ml de PBS o 0,5 ml de quemerina15-ratón (0,32 ng/kg). Tras 4 horas se sacrificaron tres animales por grupo de tratamiento y se lavaron las cavidades peritoneales con 5 ml de PBS-EDTA 3 mM. Se obtuvieron recuentos de células totales usando la prueba de exclusión de azul tripano. Para la determinación de la composición celular (neutrófilos frente a fagocitos mononucleares), se bloquearon células con AcM 2.4G2 anti-Fc $\gamma$ RII/III durante 5 min y se tiñeron con AcM anti-Ly-6G de ratón conjugado con PE y AcM anti-7/4 de ratón conjugado con FITC durante 10 min. Se fijaron las células en formaldehído al 1% antes del análisis de FACS con el software CellQuest. Se construyeron compuertas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>alto</sup>) y monocitos inflamatorios (Mo; 7/4<sup>alto</sup>, Ly-6G<sup>bajo</sup>). C15 se refiere a quemerina15-ratón.  $p < 0,01$  \*\* con respecto a tratados con PBS. Ns se refiere a diferencia no significativa estadísticamente  $p > 0,05$ .

Tal como puede observarse a partir de los resultados la figura 9, 0,32 ng/kg de C15m no provocan la migración de monocitos o neutrófilos. Sin embargo, se observa una reducción significativa de TNF $\alpha$ .

Este modelo, que estudia peritonitis estéril en ratones se usa ampliamente en medicina y farmacología experimentales, y representa una inflamación leve provocada por traumatismo o infección tisular moderados. Los resultados indican que C15m puede lograr un efecto antiinflamatorio terapéutico.

Quemerina13-humana modificada suprime la expresión del transcrito de Rantes y TNF $\alpha$  en macrófagos murinos

Se cultivaron macrófagos peritoneales murinos (PM $\theta$ ) en diversas condiciones: no tratados, LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h, pretratamiento con quemerina13-humana modificada (1 nM) durante 1 h, luego LPS/IFN $\gamma$  durante 15 h. Las gráficas de barras muestran la expresión media de transcrito de citocina determinada mediante qRT-PCR y normalizada para la hipoxantina fosforribosiltransferasa, HPRT, de mantenimiento. Se realizaron experimentos con determinaciones por triplicado para cada tratamiento,  $n = 1$  experimento independiente.  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,05$  \* con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN $\gamma$  a menos que se indique lo contrario. La secuencia del péptido C13h modificado es NH $_2$ -FHSFYFPGQFAFS-COOH (SEQ ID NO: 43), en esta secuencia el P N-terminal en C13h se ha remplazado por el aminoácido F, y el péptido se denomina por tanto C13h modificado.

Tal como puede observarse a partir del resultado en la figura 10, C13h modificado redujo significativamente la expresión de TNF $\alpha$  y RANTES.

Quemerina17-ratón no afecta a la quimiotaxis de macrófagos inducida por C140

Se reclutaron PM $\theta$  tras una estimulación peritoneal de 4 días con perlas BioGEL. Se lavaron las cavidades peritoneales de ratones C57B16/J macho con 5 ml de PBS-EDTA 2 mM. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en RPMI complementado con BSA al 0,5% y Hepes 25 mM. Se permitió que las células ( $0,5 \times 10^6$ ) migraran hacia el quimioatrayente (C140, C17m o C17m + C140) en el pocillo inferior a lo largo de 4 h. Se fijaron los filtros en formalina al 4%, entonces se tiñeron los núcleos con DAPI y se visualizaron. Se usaron medios libres de suero como control negativo (-/-). Se preincubaron células con toxina pertúsica (PTX) durante 30 min antes del ensayo de quimiotaxis. Las gráficas de barras en la figura 11 muestran el índice de migración media  $\pm$  EEM para

cada grupo de tratamiento. Cada barra representa pocillos al menos por triplicado y al menos 3 imágenes tomadas por tratamiento.  $p < 0,001$  \*\*\*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,05$  \* con respecto a pocillos tratados con SFM a menos que se indique lo contrario.

5 Los resultados en la figura 11 muestran que la coadministración de C17m con C140 no pareció afectar a la migración de macrófagos con respecto a C140.

Quemerina15-ratón y quemerina17-ratón suprimen la secreción de  $TNF\alpha$  por macrófagos murinos estimulados con zimosano

10 Se cultivaron  $PM\theta$  en diversas condiciones: no tratados; zimosano durante 15 h; pretratamiento con quemerina (1 pM) durante 1 h + zimosano durante 15 h. Las gráficas de barras muestran la expresión media de  $TNF\alpha$  tal como se determinó mediante ELISA  $\pm$  EEM. Se realizaron experimentos con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. En la figura 12 se muestran datos representativos de tres experimentos independientes que emplean células de diferentes donantes.  $p < 0,001$  \*\*\*;  $p < 0,01$  \*\* con respecto a muestras tratadas con zimosano. Dexa se refiere a dexametasona (1 mM), nd se refiere a por debajo del límite de detección inferior (0,25 ng/ml).

15 Tal como puede observarse, el tratamiento con C15m (1 pM) y C17m (1 pM) suprimió la expresión de TNF inducida por zimosano (C15m; 21%, C17m; 30%). Por tanto C15m y C17m suprimen la activación de macrófagos inducida tanto por bacterias (LPS) como por levaduras (zimosano A).

El análisis en damero demuestra que quemerina140 y quemerina15-ratón inducen quimiotaxis de macrófagos, no quimiocinesis

20 El análisis en damero permite la diferenciación entre quimiotaxis y quimiocinesis. La quimiotaxis está indicada por la migración hacia una concentración superior de quimioatrayente en el pocillo inferior. Quimiocinesis se refiere a aumento del movimiento celular no direccional y se produce independientemente del gradiente de concentración presente. Se realizó un análisis en damero preincubando células con C140 (10-500 pM) o C15m (10-1000 pM) y permitiendo que migraran hacia C140 (10-1000 pM) o C15m (10-1000 pM), respectivamente en el pocillo inferior para formar un damero de concentraciones.

25 Más específicamente, se reclutaron  $PM\theta$  tras una estimulación peritoneal de 4 días con perlas BioGEL. Se lavaron las cavidades peritoneales de ratones C57B16/J macho con 5 ml de PBS-EDTA 2 mM. Se centrifugaron las células y se resuspendieron en RPMI complementado con BSA al 0,5% y Hepes 25 mM. Se incubaron las células ( $0,5 \times 10^6$ ) con C140 o C15m durante 30 min antes del ensayo de quimiotaxis y entonces se permitió que migraran hacia el quimioatrayente en el pocillo inferior a lo largo de 4 h. Se fijaron los filtros en formalina al 4%, entonces se tiñeron los núcleos con DAPI y se visualizaron. Se usó medio libre de suero (SFM) como control negativo (-/-) y RANTES de quimiocina CC como control positivo (25 ng/ml). Las gráficas de barras en la figura 13 muestran el índice de migración media  $\pm$  EEM para cada grupo de tratamiento. Cada barra representa pocillos al menos por triplicado y al menos 3 imágenes tomadas por tratamiento.  $p < 0,001$  \*\*\* con respecto a pocillos tratados con SFM.

35 Se encontró que C140 y C15m provocan una quimiotaxis verdadera más que quimiocinesis ya que la migración al pocillo inferior de la cámara de Boyden sólo se produjo cuando se colocó una concentración superior de quimioatrayente en el mismo y no cuando se colocó en el lado superior del filtro.

Se muestra que C15m es un inductor mucho más débil de la quimiotaxis de macrófagos que C140.

C15 induce la fagocitosis por macrófagos de zimosano

40 Para el reconocimiento *in vitro* de zimosano por los macrófagos, se aislaron células de exudado peritoneal mediante lavado con EDTA 2 mM helado en PBS de ratones que se habían tratado por vía intraperitoneal 4 d antes con perlas Biogel (al 2% p/v). Se sembraron en placa los macrófagos en placas de 24 pocillos a una densidad de  $2,5 \times 10^5$  células por pocillo en medio Optimem. Se lavaron células tres veces con medio antes de la adición de zimosano marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Invitrogen) en ensayos de reconocimiento a razones de macrófago/partícula de 10:1 en presencia de quemerina15 o bien 0,1 pM, 1 pM, 10 pM, 100 pM o bien 1 nM. Vehículo = muestra control sin quemerina15. Se siguió la captación de FITC-zimosano mediante análisis de FACS y se expresa como índice de reconocimiento relativo, es decir la razón del % de células que captan zimosano x la razón de medias geométricas de macrófagos tratados con C15/media geométrica de macrófagos tratados con vehículo.

50 Los resultados mostrados en la figura 15 indican que quemerina15 induce la fagocitosis por macrófagos de zimosano. La inducción de la fagocitosis por macrófagos es máxima a una concentración de quemerina15 de 10 pM. Estos resultados demuestran que los péptidos de quemerina pueden acelerar la reparación de heridas aumentando

la fagocitosis por macrófagos de células apoptóticas, residuos celulares, patógenos y productos de patógenos.

## Discusión

Se sabe que múltiples mediadores coordinan los acontecimientos iniciales de la inflamación aguda. Por ejemplo, eicosanoides derivados de lípidos, citocinas y quimiocinas regulan alteraciones vasculares y el reclutamiento de células inflamatorias. Las citocinas proinflamatorias, incluyendo  $\text{TNF}\alpha$  e  $\text{IL-1}\gamma$  activan rutas de señalización en células endoteliales, dando como resultado la regulación por incremento de la expresión de moléculas de adhesión, facilitando la captura de leucocitos circulantes. Los resultados presentados anteriormente muestran que péptidos C-terminales derivados de quemerina140 pueden suprimir todos los componentes de la respuesta inflamatoria. Los resultados también muestran que péptidos C-terminales derivados de quemerina140 pueden reducir los niveles de quimiocinas y podrían usarse como terapia para el choque endotóxico.

Todos los péptidos usados en este estudio se derivan de quemerina, y presentan una potencia increíblemente alta ( $10^{-12}$  M) que garantiza que estos mediadores forman parte de quimiotaxina derivada del complemento,  $\text{C5a des-arg}$  ( $10^{-12}$  M), formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP;  $10^{-11}$  M), leucotrieno B4 (LTB4;  $10^{-11}$  M),  $\text{TNF}\alpha$  ( $10^{-11}$  M), LPS ( $10^{-15}$  M) e  $\text{IL-1}$  ( $10^{-14}$  M). El solicitante no conoce ninguna preparación farmacéutica que se haya demostrado que presenta efectos fisiológicos a  $10^{-11}$  M -  $10^{-15}$  M. De hecho, comúnmente se administra dexametasona a concentraciones en el intervalo micromolar *in vitro* y logra una regulación por disminución del 50% del flujo de entrada de monocitos y neutrófilos en el modelo de peritonitis inducida por zimosano a 30  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  (1,2 mg/kg). Quemerina15-ratón reguló por disminución el reclutamiento de monocitos y neutrófilos hasta un grado similar a 30  $\mu\text{g}$  de dexametasona. Quemerina15-ratón produce efectos antiinflamatorios equivalentes en este modelo murino de inflamación con una dosis de sólo 8  $\mu\text{g}$  por ratón (0,32 ng/kg).

Ensayos de quimiotaxis secundarios permitieron que se cuantificara el potencial quimiotáctico de sobrenadantes a partir de ensayos de activación de macrófagos, y que se determinara el impacto de la supresión de quimiocinas mediada por quemerina sobre las propiedades quimiotácticas de los medios. El análisis de estos resultados reveló la reducción de la migración de macrófagos hacia sobrenadantes de macrófagos tratados con quemerina + LPS/ $\text{IFN}\gamma$  en comparación con LPS/ $\text{IFN}\gamma$  solos, indicando una supresión general de una amplia gama de quimioatrayentes de macrófagos. Los ejemplos facilitados demuestran las propiedades quimioatrayentes limitadas o inexistentes de péptidos antiinflamatorios derivados de quemerina en comparación con C140.

En conclusión, los resultados muestran que péptidos C-terminales de quemerina presentan propiedades antiinflamatorias extremadamente potentes *in vitro* e *in vivo*.

## 30 Materiales y métodos

### Animales

Todos los estudios con animales se realizaron con la aprobación ética local y según las regulaciones del ministerio del interior del R.U. (Guidance on the Operation of Animals, Scientific Procedures Act, 1986).

### Anticuerpos y reactivos

35 Se adquirieron Ac anti-quemerina humana, Ac anti-quemerina murina, hquemerina 137 (secuencia ID n.º: 31, disponible de RandD como Glu21-Ser157 recombinante), mquemerina 140 (SEQ ID NO: 34), Ac de captura anti-mRANTES, Ac de detección anti-mRANTES, mRANTES, m $\text{TNF}\alpha$ , Ac de captura anti-m $\text{TNF}\alpha$ , Ac de detección anti-m $\text{TNF}\alpha$  de R&D Systems. Se sintetizaron péptidos de quemerina (C11m, C13m, C13h, C15m, C17m) mediante biosíntesis ([www.biosyn.com](http://www.biosyn.com)). Se obtuvieron dexametasona, lipopolisacárido (*E. coli*), leupeptina de Sigma Aldrich.

40 Se adquirió interferón gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) de Peprotech. Se obtuvieron comprimidos de OPD de Dakocytomata, se adquirieron estreptavidina-HRP y tampón de dilución StrepAv-HRP de Endogen. Se proporcionó el kit Luminex 6-plex (IL-12 p40, IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-10) por Bio-rad y se analizó usando un bioanalizador de Bio-rad y software X.

### Inhibición de la activación de macrófagos, ensayo de activación de macrófagos

45 Se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p.) 1 ml de perlas de poliacrilamida BioGEL al 2% en solución salina tamponada con fosfato (PBS) estéril en ratones C57B1/6J. Cuatro días tras la administración de BioGEL por vía i.p., se sacrificaron los ratones mediante el método de  $\text{CO}_2$  según directrices del ministerio del interior. Se lavaron las cavidades peritoneales con 10 ml de PBS estéril-EDTA 2 mM para recoger el infiltrado celular inducido/provocado por BioGEL. Se centrifugaron las suspensiones de células recogidas a 1000xg durante 5 min a 4°C. Se desecharon los sobrenadantes y se resuspendieron los sedimentos celulares en 6 ml de medio OptiMEM complementado con glutamina 2 mM, penicilina 50 unidades/ml y estreptomycin 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Se cuantificaron los macrófagos tras la

50

incubación sobre hielo durante 5-10 min con solución de Turk usando un hemocitómetro. Se sembraron en placa suspensiones de células (2 ml;  $1,5 \times 10^6$ /pocillo) en placas de cultivo tisular de seis pocillos (35 mm de diámetro: Costar, R.U.) y se permitió que se adhirieran durante 2 horas a 37°C en un atmósfera humidificada que contenía el 5% de CO<sub>2</sub> para aislar las poblaciones de macrófagos mediante adherencia. Esto dio una pureza de más del 95% evaluada mediante citocentrifugación, tinción de células con azul de metileno y eosina y recuento basado en la morfología celular. Se desecharon las células no adherentes (principalmente granulocitos) y se lavaron los pocillos tres veces con PBS estéril para eliminar células muertas o débilmente adherentes. Con el fin de evaluar la posible supresión de la activación de macrófagos y por tanto una reducción en la expresión de mediadores proinflamatorios, se preincubaron macrófagos ( $1,5 \times 10^6$  células/pocillo) con péptidos de quemerina (C11m, C13m, C15m, C17m;  $10^{-12}$  -  $10^{-8}$  M) o control positivo (dexametasona; 1 µM) durante 1 h y luego se expusieron a LPS (100 ng/ml) e IFN $\gamma$  (20 ng/ml) durante 15 h. Para determinar la sensibilidad a PTX y la dependencia de la proteólisis, se preincubaron las células con PTX (200 ng/ml) o leupeptina (15 µg/ml). Se trataron células adicionales con péptidos solos. Se recogieron los sobrenadantes y se almacenaron a -20°C hasta su uso en ensayos de inmunoabsorbancia ligados a enzimas (ELISA) y ensayos Luminex. Se lisaron las células para permitir la extracción de ARN total mediante el método de TRIZOL. Se almacenaron los lisados a -80°C hasta la extracción del ARN siguiendo las directrices del fabricante (Qiagen, kit RNeasy Mini Prep).

#### Detección de proteína secretada mediante ELISA y Luminex

Se evaluaron las concentraciones de RANTES, factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) y CCL9 en sobrenadantes celulares mediante ELISA. Se determinaron los niveles de IL-12 p40, IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , MCP-1 (proteína quimioatrayente de monocitos-1) e IL-6 mediante ensayo con perlas multiplexado Luminex (ensayo 6-plex de Biorad). Los límites de detección inferiores para ELISA eran 0,1-0,5 ng/ml y 10-50 pg/ml para ensayos Luminex.

#### Preparación de ARN y RT-PCR

Se extrajo ARN total usando kits RNeasy de Qiagen, se transcribió de manera inversa y se sometió a qRT-PCR usando el método de Sybr-Green. Se analizaron los datos usando el método de 2- $\Delta\Delta$ CT (Livak, K.J. y Schmittgen T.D. (2001), Methods 25:402-408).

#### Ensayo de quimiotaxis

Se evaluó la migración celular usando membranas transpocillo (ChemoTX, 6 mm de diámetro, 8 µm de tamaño de poro). Brevemente, se recogieron células obtenidas en BioGEL y se colocaron sobre membranas transpocillo (250.000 células/membrana en RPMI complementado con Hepes 25 mM y albúmina sérica bovina al 0,1%. Se permitió que las células migraran hacia péptidos de quemerina (1 pM - 100 nM) durante 4 h. Se bloqueó la transducción de señales por medio de receptores acoplados a proteína G preincubando células con toxina pertúsica (PTX, 200 ng/ml, Sigma-Aldrich) durante 30 min antes de colocar las células sobre membranas transpocillo. Se fijaron las células que habían migrado sobre la parte inferior de las membranas (formaldehído al 3%) y se tiñeron con DAPI. Se cuantificó la migración como recuento de píxeles totales de núcleos teñidos con DAPI bajo el microscopio confocal (2 fotos/membrana y un mínimo de 3 pocillos replicados por tratamiento). Se analizaron las imágenes usando software Metamorph Offline para determinar el porcentaje de áreas umbral (TA) ocupadas por células que habían migrado. Se obtuvieron los índices de migración dividiendo las TA de tratamiento entre las TA de medios libres de suero. Para ensayos de quimiotaxis secundarios se usaron membranas ChemoTx de 3 mm de diámetro, 8 µm de poro con 50.000 células/membrana.

#### Peritonitis murina

Se administraron por vía i.p. a ratones C57BL6/J 500 µl de quemerina15-ratón (0,32 ng/kg) o vehículo solo (PBS estéril) 1 h antes de la administración por vía i.p. de 500 µl con 10 µg de zimosano A. Tras 4 h y sacrificio compasivo, se recogieron exudados peritoneales mediante lavado peritoneal con 5 ml de PBS estéril-EDTA 3 mM. Se obtuvo líquido de lavado libre de células para su uso en ELISA y se prepararon células de exudado para los análisis descritos a continuación.

#### Recuentos de leucocitos diferenciales y análisis de FACS

Se administraron por vía i.p. a ratones C57BL6/J 500 µl de quemerina15 (0,32 ng/kg) o vehículo (PBS) 1 h antes de la administración por vía i.p. de 500 µl con 10 µg de zimosano A. Tras 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h y 48 h y sacrificio compasivo, se prepararon alícuotas de células del lavado para la determinación de recuentos de leucocitos totales y diferenciales. Para la determinación de la composición celular (PMN frente a células mononucleares), se bloquearon células con anticuerpo 2.42G anti-Fc $\mu$ II/III de ratón (0,5 µg/ $0,1 \times 10^6$  células) durante 10 min y se tiñeron (10 min) con anticuerpo anti-7/4 de ratón conjugado con FITC y anticuerpo anti-Ly-6G de ratón conjugado con PE (0,5 µg/ $0,5 \times 10^6$  células; clones rmC5-3 y RB6-8C5, respectivamente de BD Pharmingen). Se analizaron las células



ES 2 523 511 T3

Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

5 <213> *Mus sp.*

<400> 3

Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe ser  
1 5 10

<210> 4

<211> 15

10 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 4

Ala Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10 15

<210> 5

15 <211> 16

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 5

Ala Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10 15

20 <210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 6

Ala Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10 15

25 ser

<210> 7

<211> 12

ES 2 523 511 T3

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 7

Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

5 <210> 8

<211> 13

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 8

10 Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

15 <400> 9

Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

<210> 10

<211> 13

<212> PRT

20 <213> *Mus sp.*

<400> 10

Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10

<210> 11

<211> 14

25 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 11

Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10

ES 2 523 511 T3

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

5 <400> 12

Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10 15

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

10 <213> *Mus sp.*

<400> 13

Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
1 5 10

<210> 14

<211> 15

15 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 14

Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
1 5 10 15

<210> 15

20 <211> 16

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 15

Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
1 5 10 15

25 <210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 16

ES 2 523 511 T3

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

<210> 17

<211> 12

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10

<210> 18

<211> 13

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
1 5 10

<210> 19

15 <211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10 15

20 <210> 20

<211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10 15

25

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 523 511 T3

<400> 21

Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10 15

Ser

<210> 22

<211> 12

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

<210> 23

10 <211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 23

Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

15 <210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

20 Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala  
1 5 10

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 25

Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
1 5 10

<210> 26

ES 2 523 511 T3

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 26

5                   Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
                  1                                   5                                   10

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10 <400> 27

                  Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 28

<211> 14

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

                  Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
                  1                                   5                                   10

<210> 29

<211> 15

20 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 29

                  Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
                  1                                   5                                   10                                   15

<210> 30

25 <211> 16

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 30

ES 2 523 511 T3

Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
 1 5 10 15

<210> 31

<211> 137

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 31

Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val Ala Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln Glu Thr Ser Val  
 20 25 30

Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro Ala Gly Ile Phe Val Arg Leu  
 35 40 45

Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys Arg Lys Arg Asp Trp Lys Lys  
 50 55 60

Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly Arg Lys Arg Lys Cys Leu Ala  
 65 70 75 80

Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Leu Gly Arg Leu Val His  
 85 90 95

Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg Glu Ala Glu Glu His Gln Glu  
 100 105 110

Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe  
 115 120 125

Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
 130 135

<210> 32

<211> 143

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 32

Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val Ala Leu Glu Glu  
 1 5 10 15

ES 2 523 511 T3

Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln Glu Thr Ser Val  
 20 25 30  
 Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro Ala Gly Ile Phe Val Arg Leu  
 35 40 45  
 Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys Arg Lys Arg Asp Trp Lys Lys  
 50 55 60  
 Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly Arg Lys Arg Lys Cys Leu Ala  
 65 70 75 80  
 Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Leu Gly Arg Leu Val His  
 85 90 95  
 Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg Glu Ala Glu Glu His Gln Glu  
 100 105 110  
 Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe  
 115 120 125  
 Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu Pro Arg Ser  
 130 135 140

<210> 33

<211> 163

<212> PRT

5 <213> *Homo sapiens*

<400> 33

Met Arg Arg Leu Leu Ile Pro Leu Ala Leu Trp Leu Gly Ala Val Gly  
 1 5 10 15  
 Val Gly Val Ala Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val  
 20 25 30  
 Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln  
 35 40 45  
 Glu Thr Ser Val Glu Ser Ala Val Asp Thr Pro Phe Pro Ala Gly Ile  
 50 55 60  
 Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Ser Cys Arg Lys Arg  
 65 70 75 80  
 Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Lys Val Arg Pro Asn Gly Arg Lys Arg  
 85 90 95  
 Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Leu Gly Ser Glu Asp Lys Val Leu Gly  
 100 105 110

ES 2 523 511 T3

Arg Leu Val His Cys Pro Ile Glu Thr Gln Val Leu Arg Glu Ala Glu  
 115 120 125

Glu His Gln Glu Thr Gln Cys Leu Arg Val Gln Arg Ala Gly Glu Asp  
 130 135 140

Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Lys Ala Leu  
 145 150 155 160

Pro Arg Ser

<210> 34

<211> 140

<212> PRT

5 <213> *Mus sp.*

<400> 34

Thr Val Gly Thr Glu Pro Glu Leu Ser Glu Thr Gln Arg Arg Ser Leu  
 1 5 10 15

Gln Val Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Leu Ala  
 20 25 30

Phe Gln Glu Ile Gly Val Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Phe Ser Ala  
 35 40 45

Gly Thr Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Asn Cys Pro  
 50 55 60

Lys Lys Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg  
 65 70 75 80

Arg Arg Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Met Asp Pro Lys Gly Lys Ile  
 85 90 95

Leu Gly Arg Ile Val His Cys Pro Ile Leu Lys Gln Gly Pro Gln Asp  
 100 105 110

Pro Gln Glu Leu Gln Cys Ile Lys Ile Ala Gln Ala Gly Glu Asp Pro  
 115 120 125

His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
 130 135 140

<210> 35

<211> 146

10 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 35

ES 2 523 511 T3

Thr Val Gly Thr Glu Pro Glu Leu Ser Glu Thr Gln Arg Arg Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Gln Val Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Leu Ala  
 20 25 30  
  
 Phe Gln Glu Ile Gly Val Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Phe Ser Ala  
 35 40 45  
  
 Gly Thr Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Asn Cys Pro  
 50 55 60  
  
 Lys Lys Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg  
 65 70 75 80  
  
 Arg Arg Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Met Asp Pro Lys Gly Lys Ile  
 85 90 95  
  
 Leu Gly Arg Ile Val His Cys Pro Ile Leu Lys Gln Gly Pro Gln Asp  
 100 105 110  
  
 Pro Gln Glu Leu Gln Cys Ile Lys Ile Ala Gln Ala Gly Glu Asp Pro  
 115 120 125  
  
 His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Arg Ala Leu Arg  
 130 135 140  
  
 Thr Lys  
 145

<210> 36

<211> 162

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 36

ES 2 523 511 T3

Met Lys Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ala Leu Trp Leu Gly Thr Arg Gly  
 1 5 10 15  
 Thr Val Gly Thr Glu Pro Glu Leu Ser Glu Thr Gln Arg Arg Ser Leu  
 20 25 30  
 Gln Val Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Leu Ala  
 35 40 45  
 Phe Gln Glu Ile Gly Val Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Phe Ser Ala  
 50 55 60  
 Gly Thr Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Asn Cys Pro  
 65 70 75 80  
 Lys Lys Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg  
 85 90 95  
 Arg Arg Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Met Asp Pro Lys Gly Lys Ile  
 100 105 110  
 Leu Gly Arg Ile Val His Cys Pro Ile Leu Lys Gln Gly Pro Gln Asp  
 115 120 125  
 Pro Gln Glu Leu Gln Cys Ile Lys Ile Ala Gln Ala Gly Glu Asp Pro  
 130 135 140  
 His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser Arg Ala Leu Arg  
 145 150 155 160  
 Thr Lys

<210> 37

<211> 19

5 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 37

Ala Gln Ala Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe  
 1 5 10 15

Ala Phe Ser

<210> 38

10 <211> 19

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 38

ES 2 523 511 T3

Gln Arg Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe  
1 5 10 15

Ala Phe Ser

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> C15 desordenado

<400> 39

Gly Leu Phe His Asp Gln Ala Gly Pro Pro Ala Gly Tyr Glu Phe  
1 5 10 15

10 <210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15 <223> C15 mutante

<400> 40

Ala Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Ala Leu Pro Gly Gln Ala Ala  
1 5 10 15

<210> 41

<211> 6

20 <212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 41

Arg Ala Leu Arg Thr Lys  
1 5

<210> 42

25 <211> 8

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 42

ES 2 523 511 T3

Phe Ser Arg Ala Leu Arg Thr Lys  
1 5

<210> 43

<211> 13

<212> PRT

5 <213> Artificial

<220>

<223> C13h modificado

<400> 43

Phe His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser  
1 5 10

10 <210> 44

<211> 19

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

<400> 44

Glu Leu Ser Glu Thr Gln Arg Arg Ser Leu Gln Val Ala Leu Glu Glu  
1 5 10 15

15 Phe His Lys

<210> 45

<211> 20

<212> PRT

<213> *Mus sp.*

20 <400> 45

Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg Arg Arg Lys Cys Leu  
1 5 10 15

Ala Cys Ile Lys  
20

## REIVINDICACIONES

1. Péptido aislado que consiste en (i) SEQ ID NO: 19; o (ii) la secuencia de SEQ ID NO: 19 con una o más sustituciones de aminoácido conservativas en el que el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 19.
- 5 2. Péptido aislado según la reivindicación 1, en el que el péptido está opcionalmente acetilado, acilado, alquilado o glicosilado.
3. Péptido aislado según la reivindicación 1 (parte (ii)) o la reivindicación 2, que tiene una identidad de secuencia de al menos el 90% con SEQ ID NO: 19.
- 10 4. Péptido aislado según cualquier reivindicación anterior, en el que el péptido es cíclico o de cadena lineal; y/o en el que el péptido comprende una estructura principal resistente a proteasas.
- 15 5. Uso de un péptido aislado que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 19, en el que el péptido está opcionalmente acetilado, acilado, alquilado o glicosilado, en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico; y/o para la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas; y/o el tratamiento de una herida; y/o el tratamiento y/o la prevención de inflamación.
- 20 6. Uso de uno o más péptidos que comprenden hasta 30 aminoácidos, en el que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 19 o en el que el uno o más péptidos tienen una parte que tiene la secuencia de SEQ ID NO: 19 y en el que la parte puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas, y en el que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de choque endotóxico; y/o para reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios; y/o para el tratamiento de una herida y/o para el tratamiento de inflamación.
- 25 7. Uso según la reivindicación 5 ó 6, en el que el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan del grupo que consiste en: TNF $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, G-CSF, MCP-2 (CCL-8), GRO $\alpha$  (CXCL1), GRO $\beta$  (CXCL2), IL-8 (CXCL8), TECK (CCL25), MCP-1 (CCL2), interferón  $\gamma$  y RANTES (CCL5).
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, en el que el péptido está previsto para su administración a una dosis de entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 1 mg/kg.
- 30 9. Péptido aislado según una de las reivindicaciones 1-4, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico; y/o para su uso en la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas; y/o el tratamiento de una herida; y/o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación.
- 35 10. Uno o más péptidos que comprenden hasta 30 aminoácidos, en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 19, o en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 19, y en los que la parte puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas, y en los que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, para su uso en el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico; y/o para su uso en la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas; y/o para su uso en el tratamiento de una herida; y/o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de inflamación.
11. Apósito para heridas, dispositivo médico o vendaje impregnado con un péptido aislado según una de las reivindicaciones 1-4.
- 40 12. Apósito para heridas, dispositivo médico o vendaje impregnado con uno o más péptidos que comprenden hasta 30 aminoácidos en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una identidad de secuencia de al menos el 80% con SEQ ID NO: 19, o en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19, y en los que la parte puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas, y en los que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados.
- 45 13. Composición farmacéutica que comprende un péptido aislado según una de las reivindicaciones 1-4 y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. Composición farmacéutica según la reivindicación 13 para su uso en el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico; y/o para su uso en la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas; y/o su uso en el tratamiento de una herida; y/o para su uso en el tratamiento y/o la prevención de

inflamación.

- 5 15. Composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos que comprenden hasta 30 aminoácidos, en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una identidad de secuencia de al menos el 80% con una secuencia de SEQ ID NO: 19, o en los que el uno o más péptidos tienen una parte que comprende una secuencia de SEQ ID NO: 19, y en los que la parte puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas, y en los que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, y un diluyente, portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que la composición es para su uso en el tratamiento y/o la prevención de choque endotóxico; y/o para su uso en la reducción del nivel de uno o más mediadores inflamatorios; y/o para su uso en el tratamiento de una herida; y/o para su uso en la tratamiento de inflamación.

10

Figura 1A

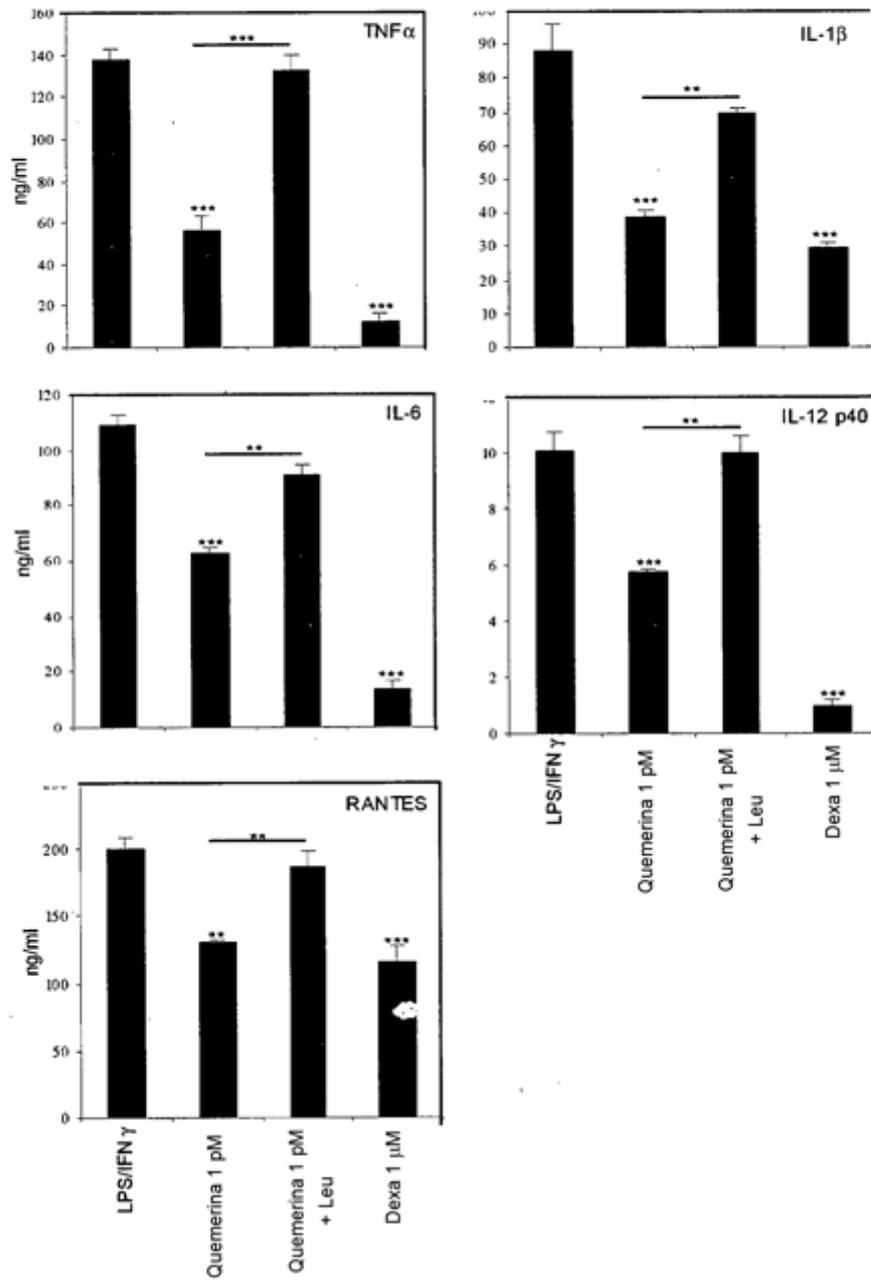


Figura 1B

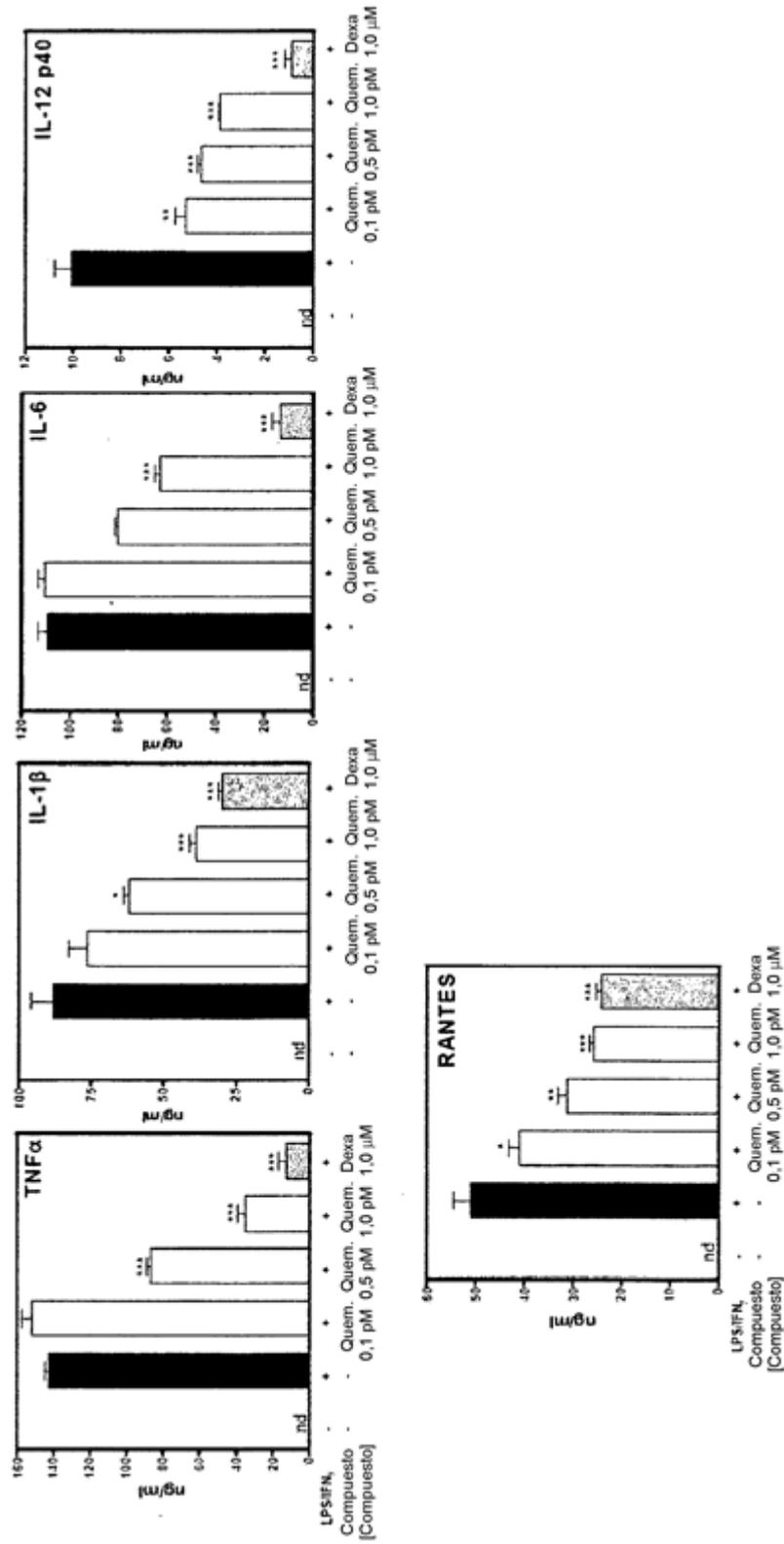


Figura 1C

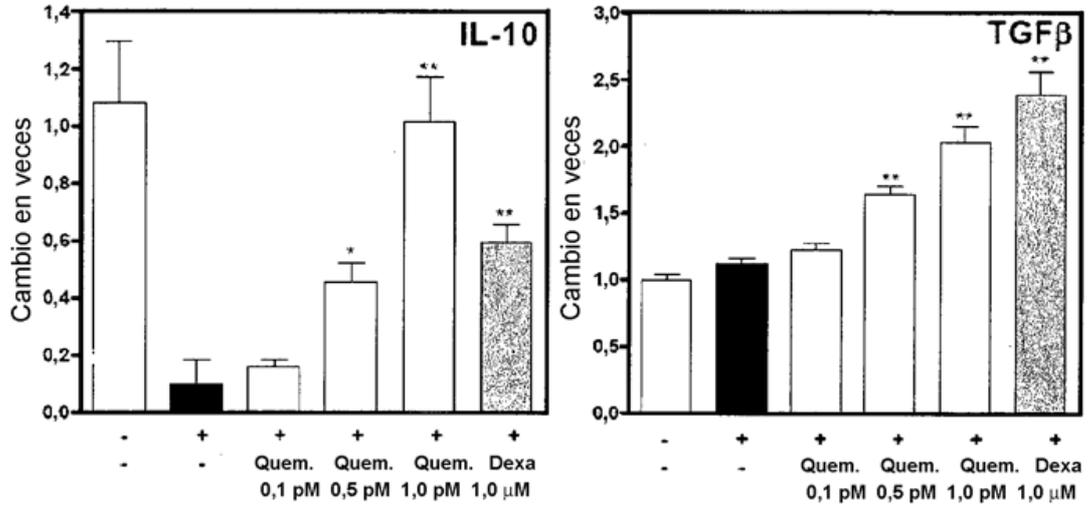


Figura 1D

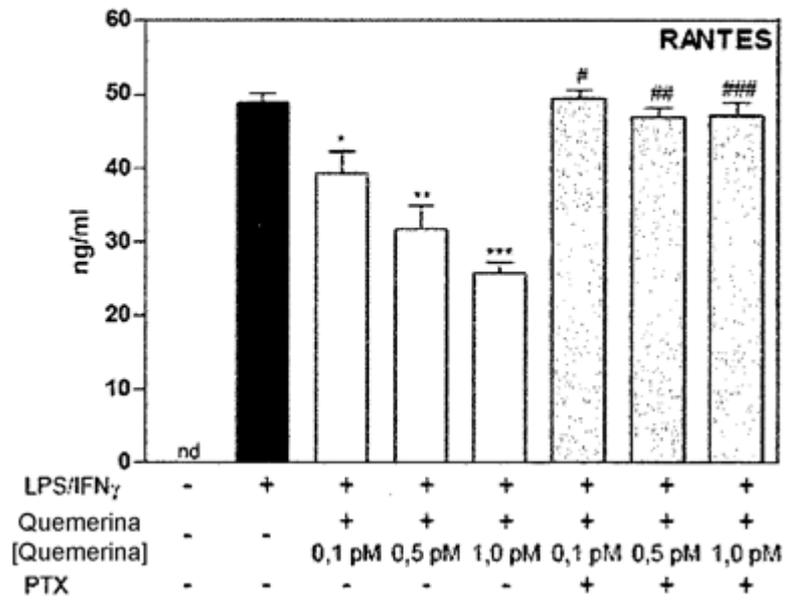


Figura 1E

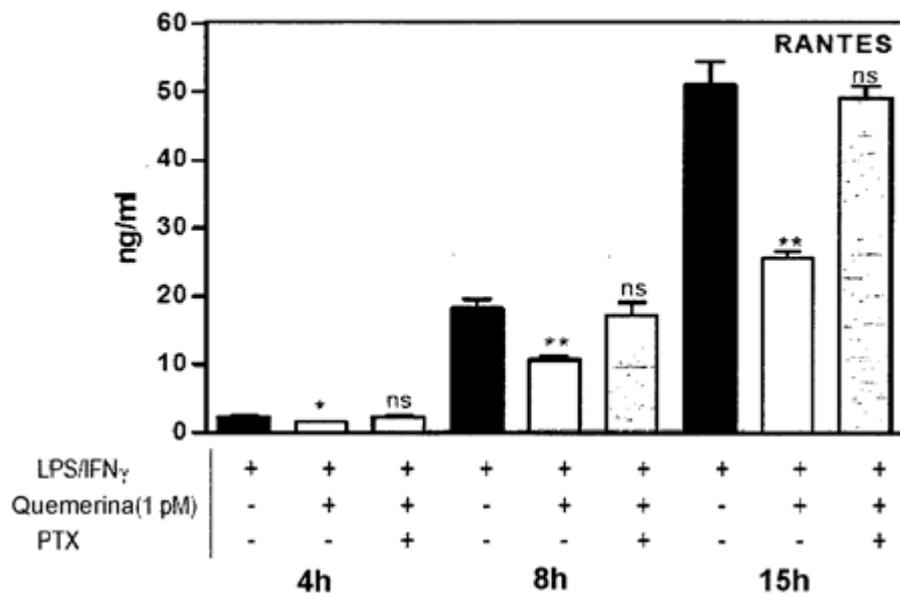
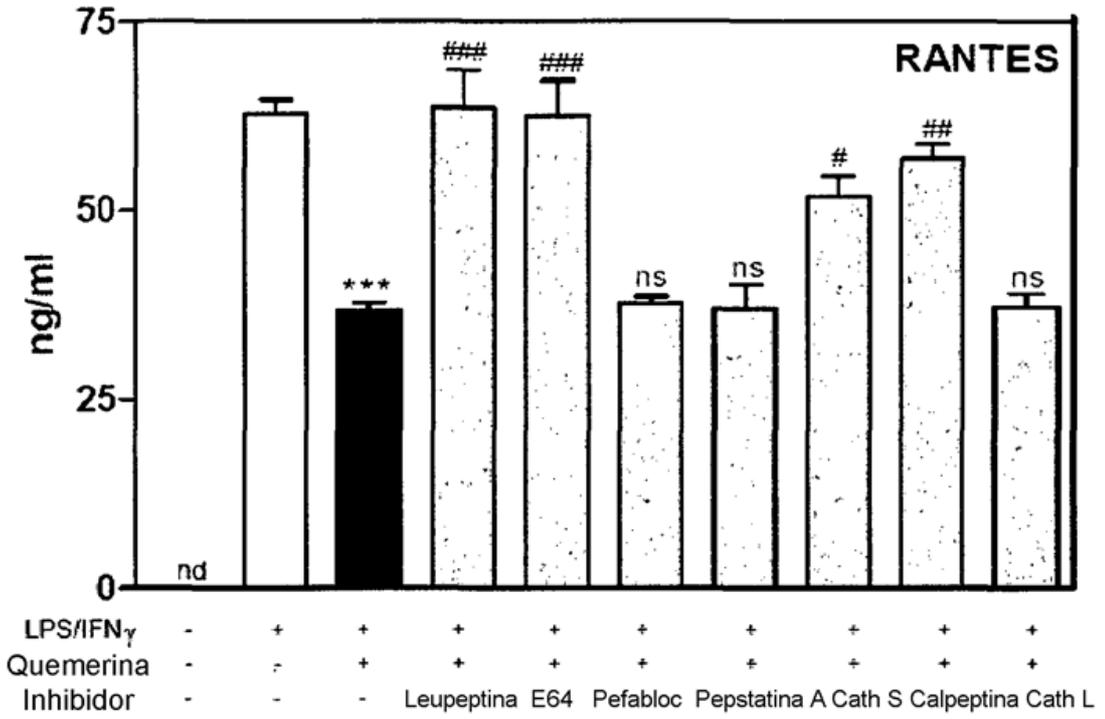


Figura 1F



```

1 MRRLIPLALWLAGVQ:VQVA.EELTEAQRISLQVALEEFHKKHPPVQWAFQETSVESAVDTPL
Homo sapiens
Mus musculus 1 10 21 30 40 50 60
60 P A Q I F V R L E F K L Q Q T S C R K R D W K K P E C K I V R P N Q R K I R K I C L A C I K L Q S E D K V L G R L V H C P I E
Homo sapiens
Mus musculus 70 80 90 100 110 120
130 T Q V L R I E A E E H Q E T Q C L R V Q R I A G E D P H S F Y F P G Q F A F S K A L P R I S
Homo sapiens
Mus musculus 140 150 160 163
Quemerina11 P H Q Y F L P G Q F A F I S
Quemerina13 P H Q Y F L P G Q F A F I S
Quemerina15 A G E D P H Q Y F L P G Q F A F I S
Quemerina17 A G E D P H Q Y F L P G Q F A F I S

```

Figura 2A

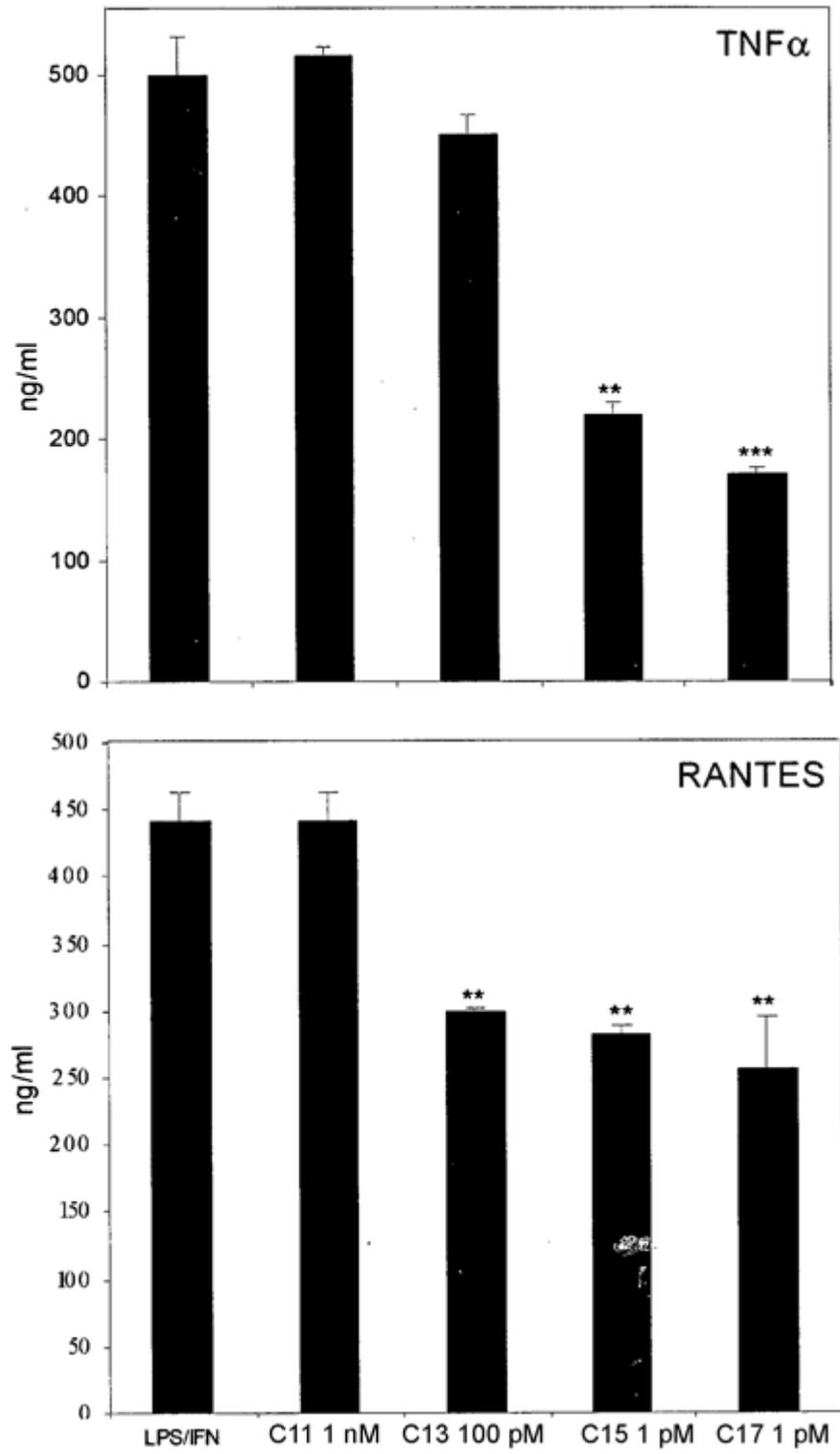


Figura 2B

Figura 3

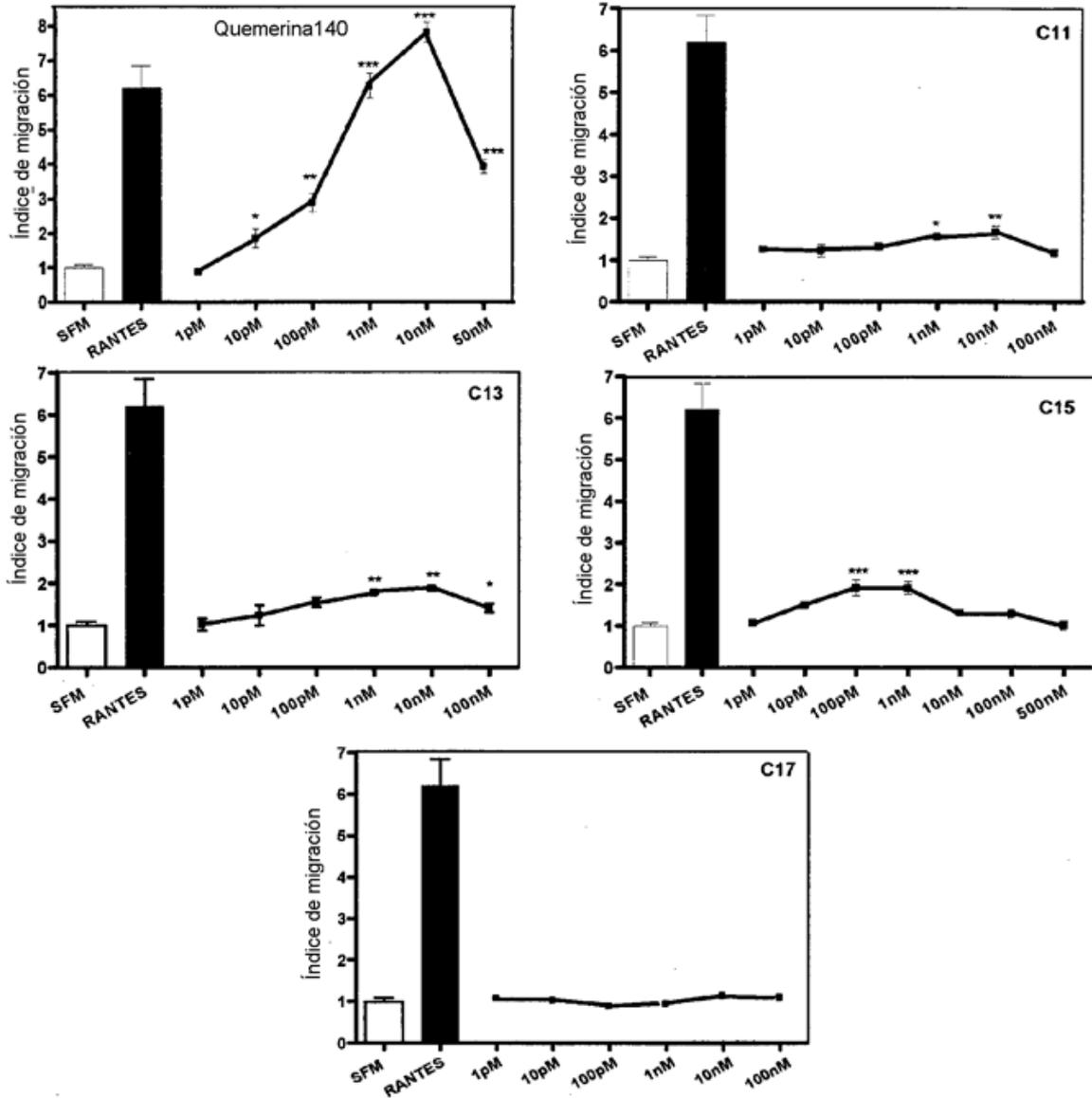


Figura 4

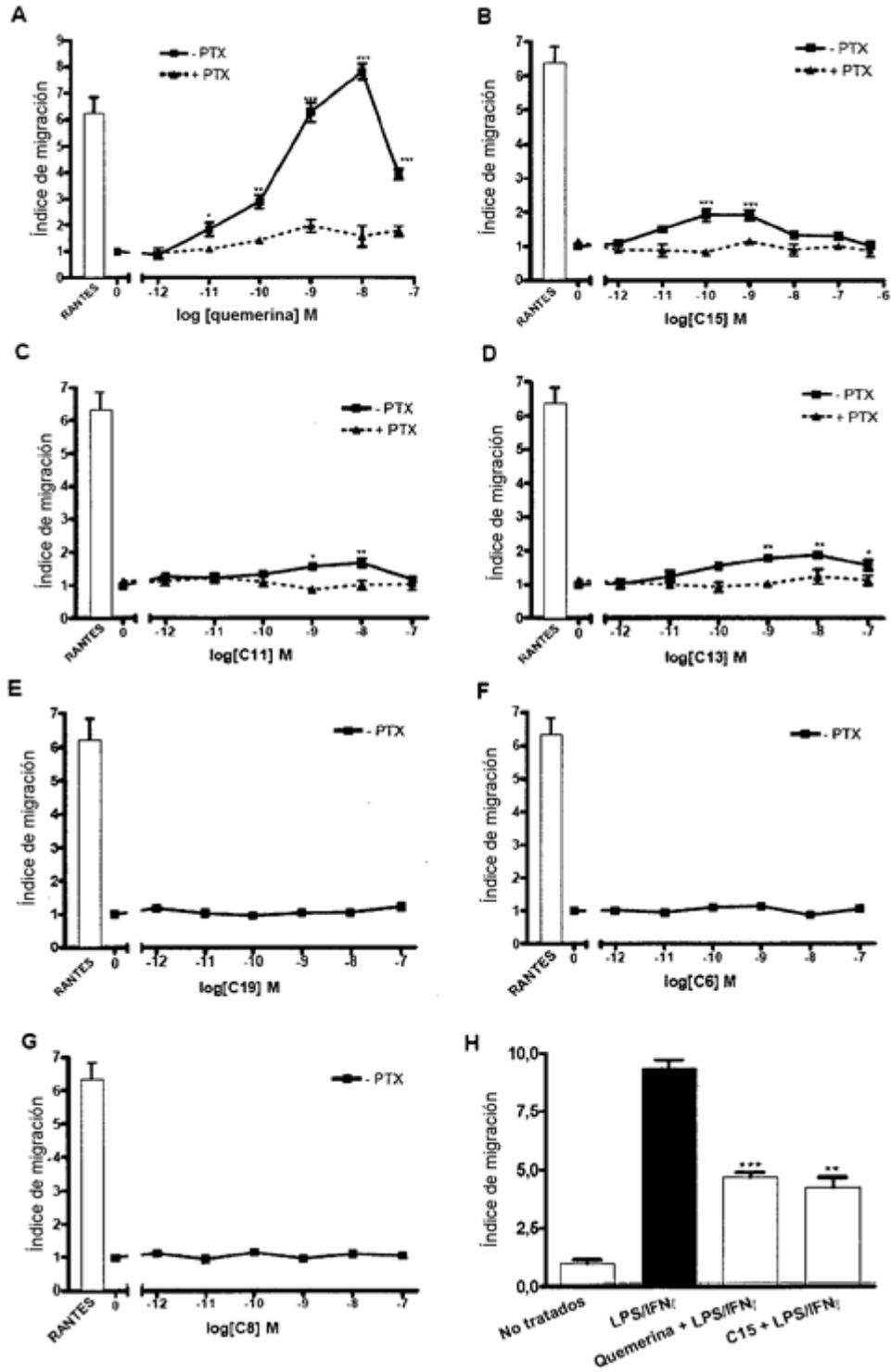


Figura 5

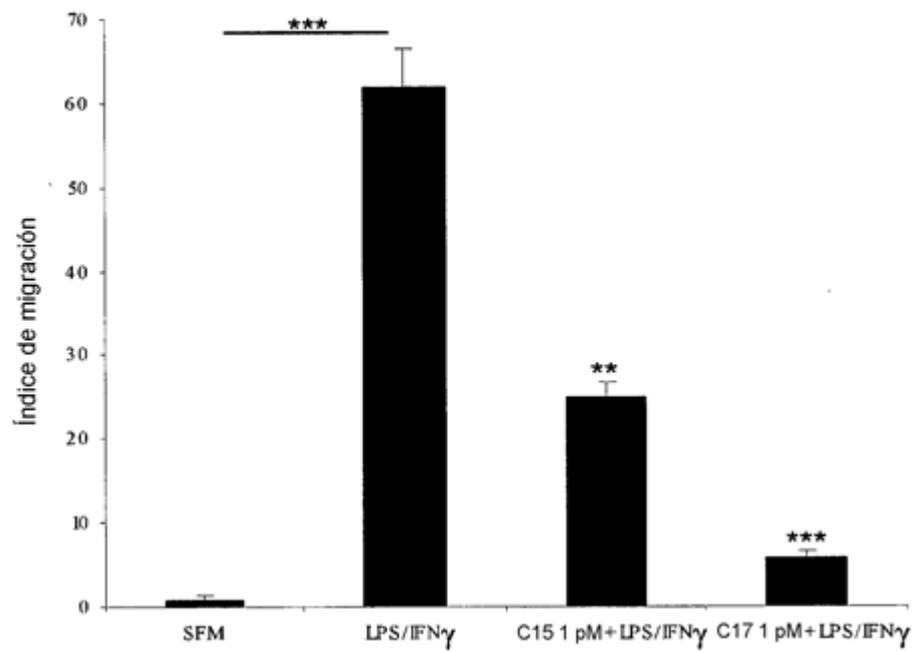
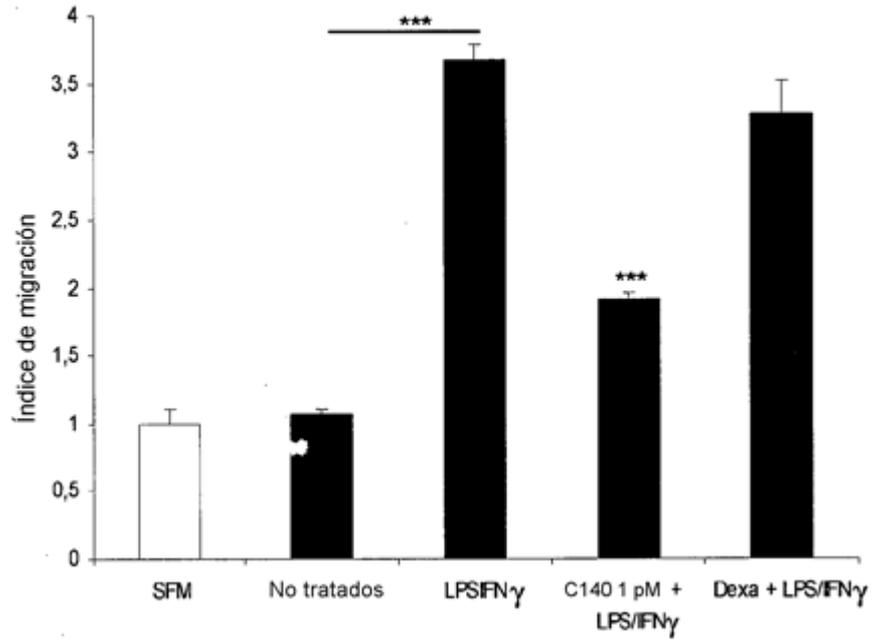


Figura 6

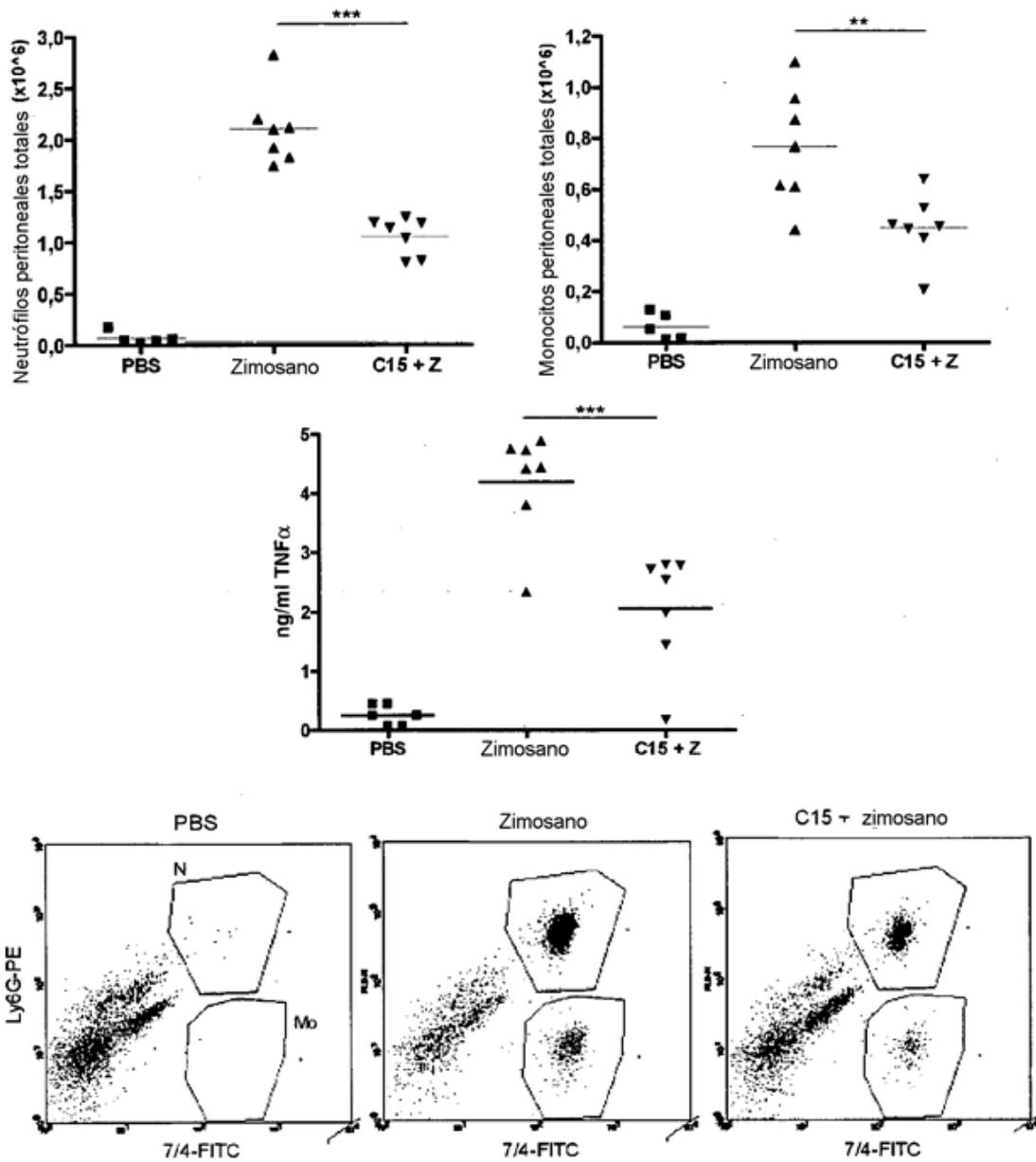


Figura 7

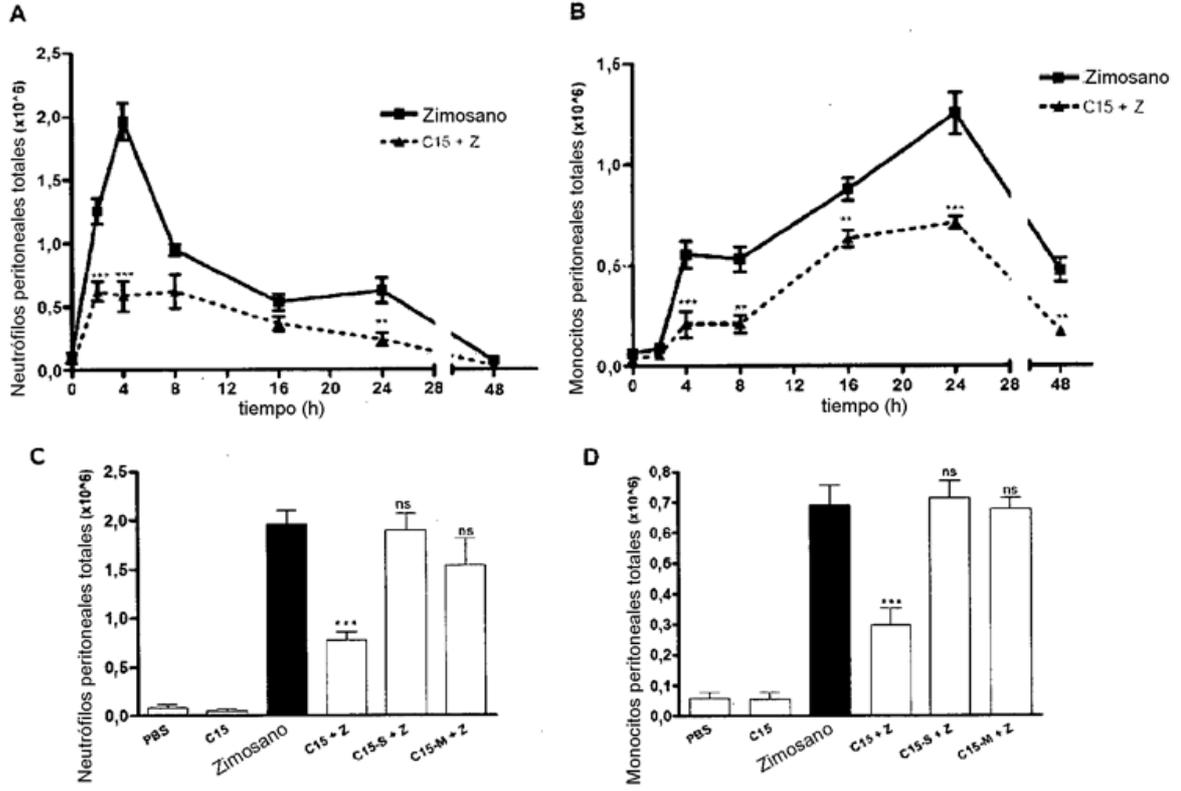


Figura 7, continuación

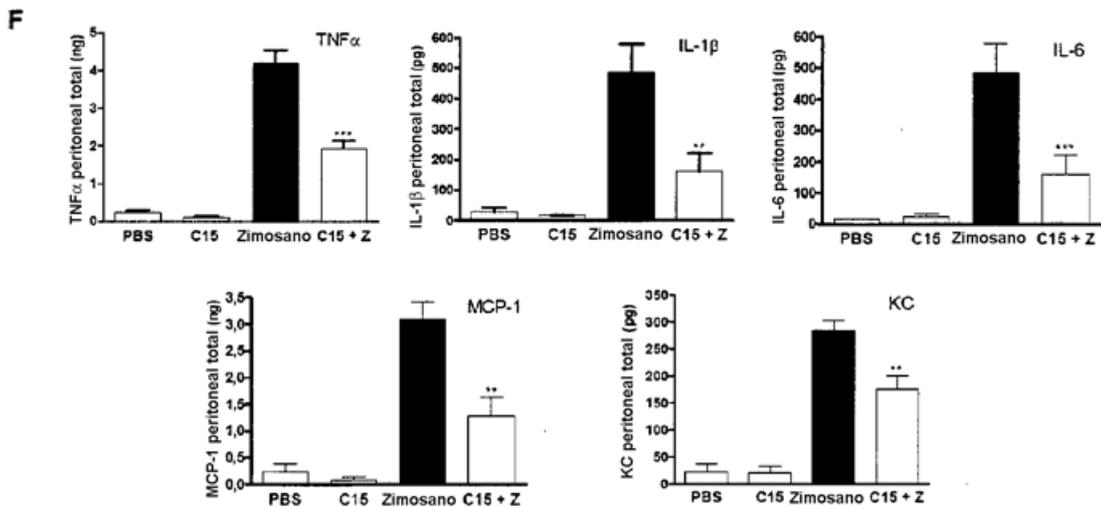
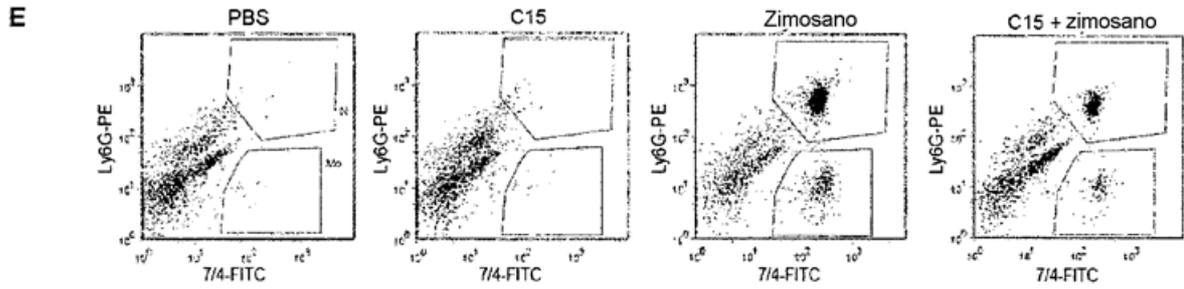


Figura 7, continuación

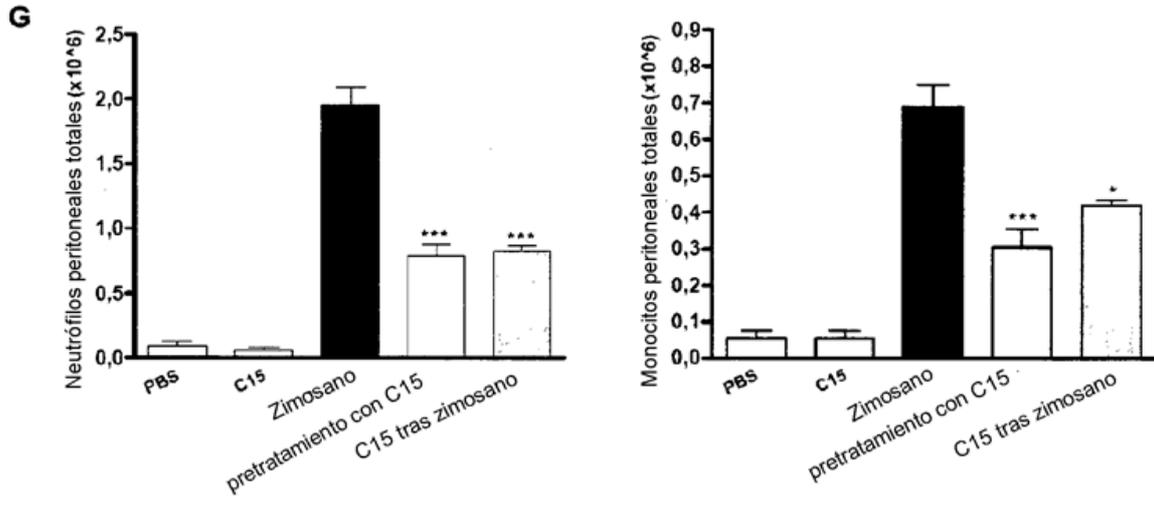
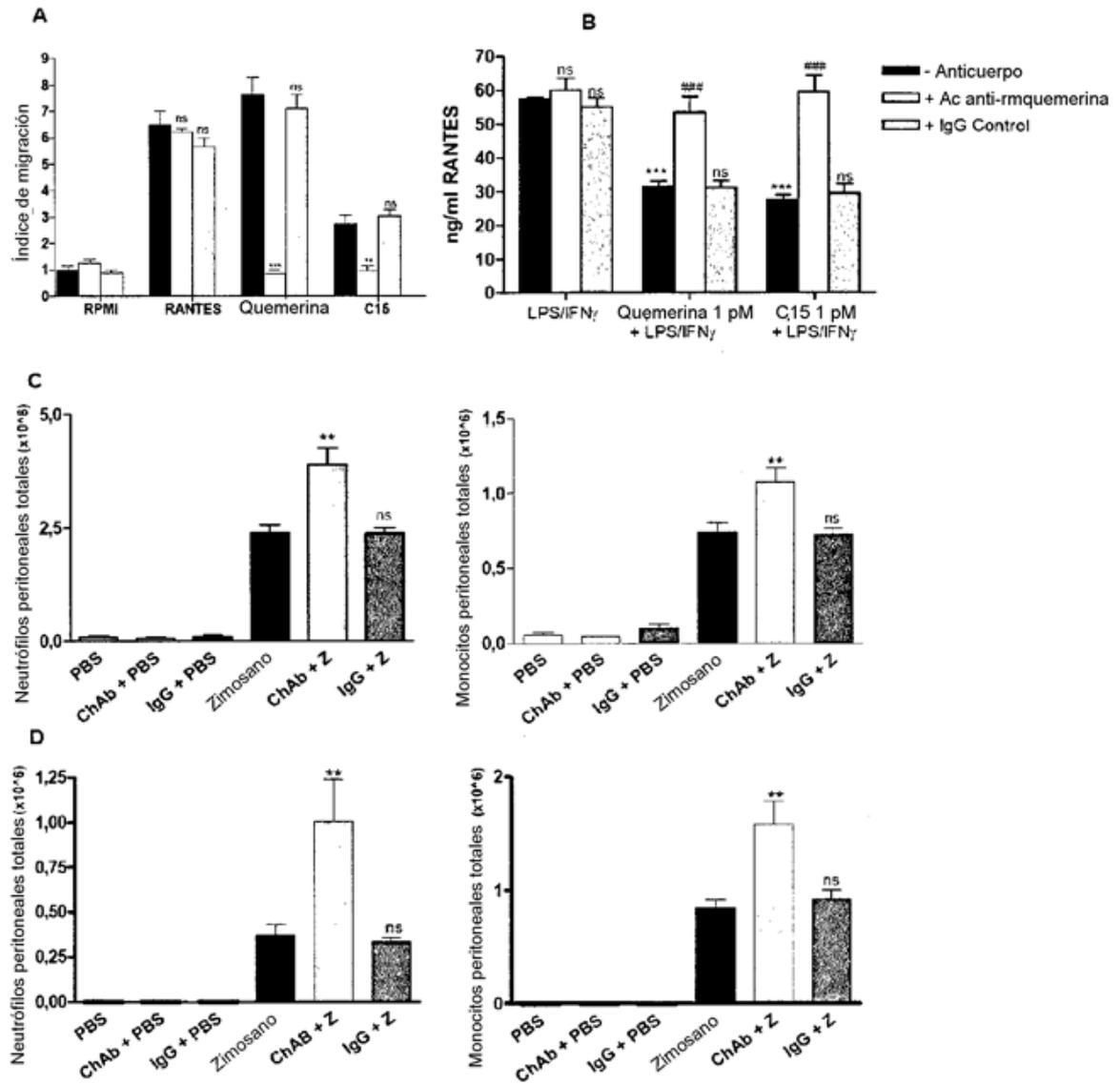


Figura 8



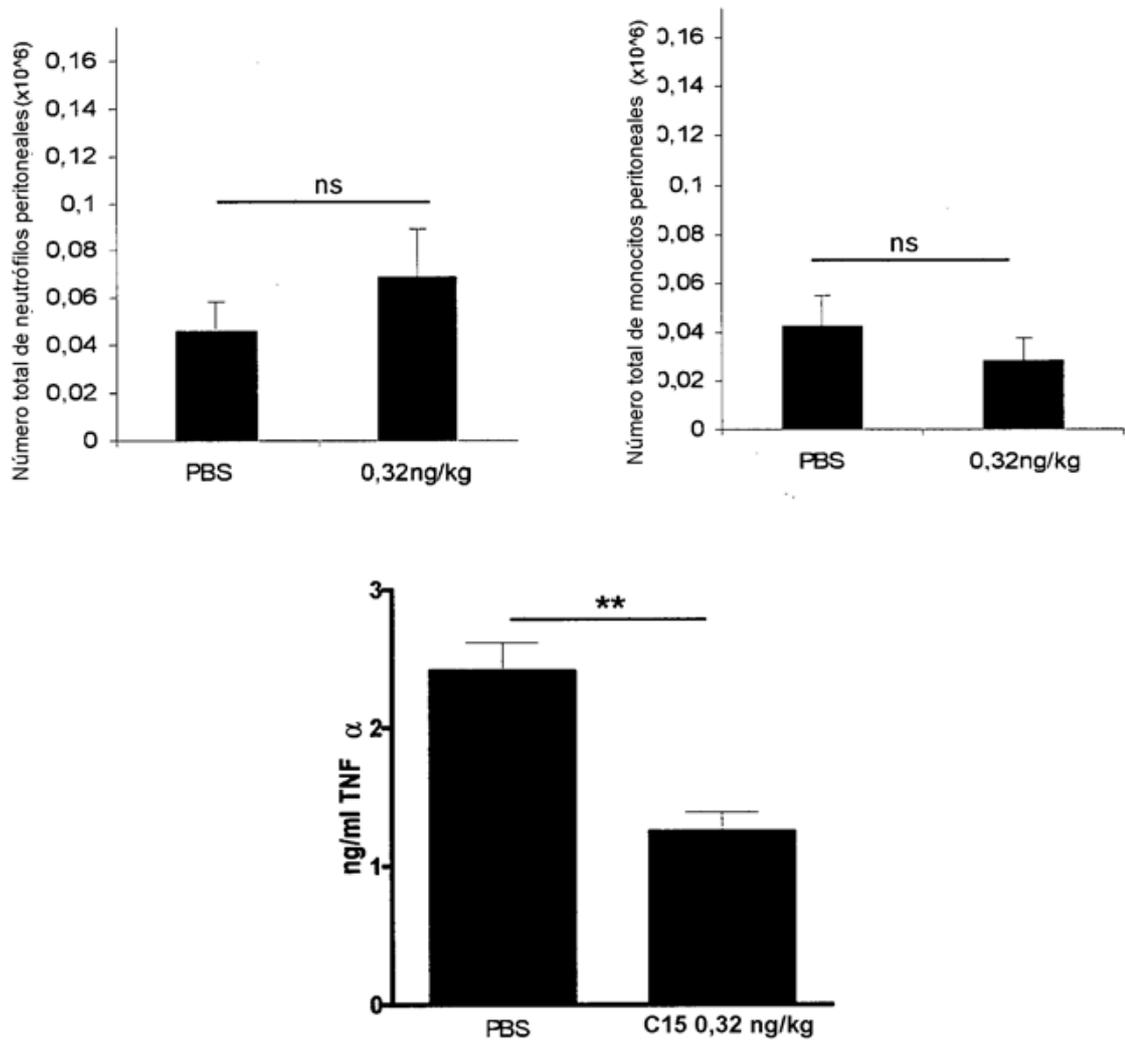


Figura 9

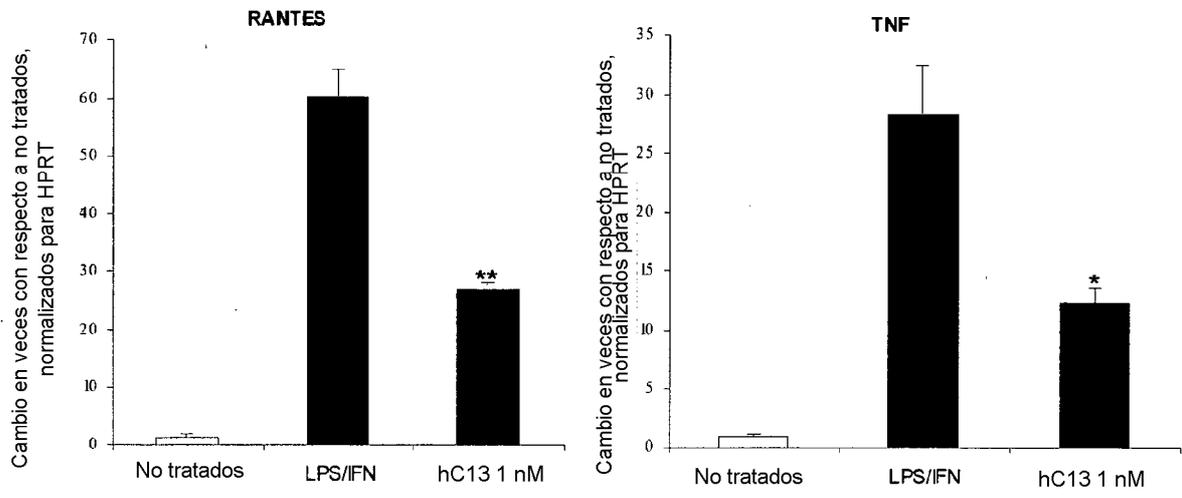


Figura 10

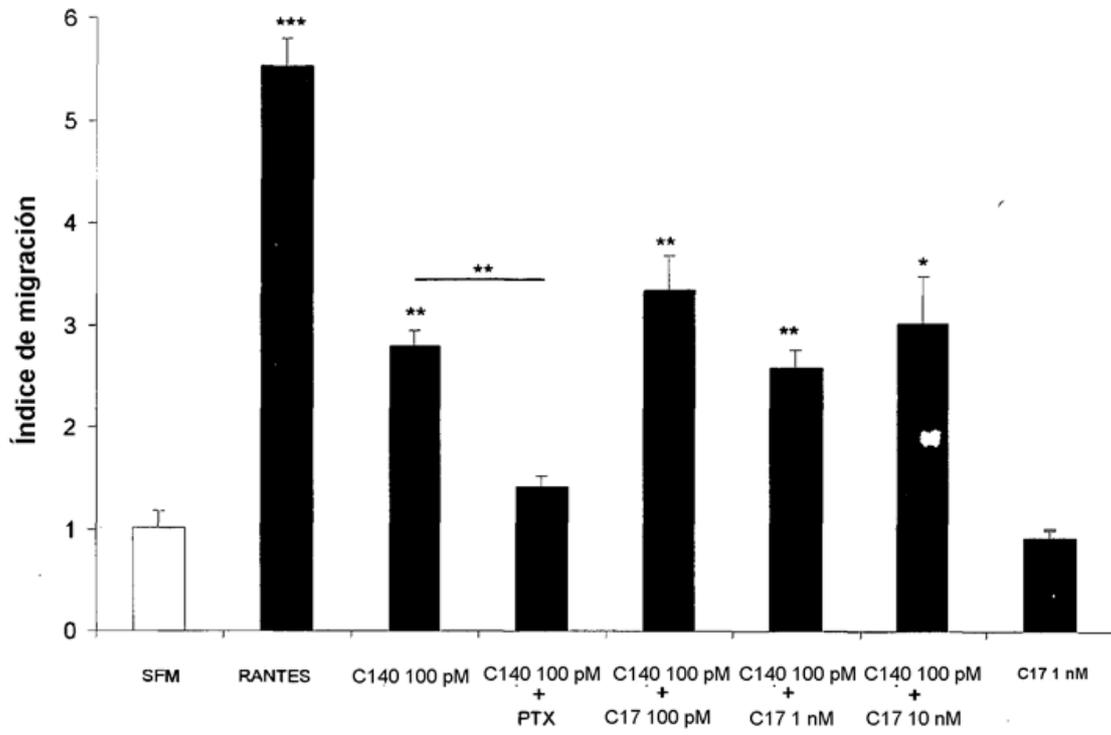


Figura 11

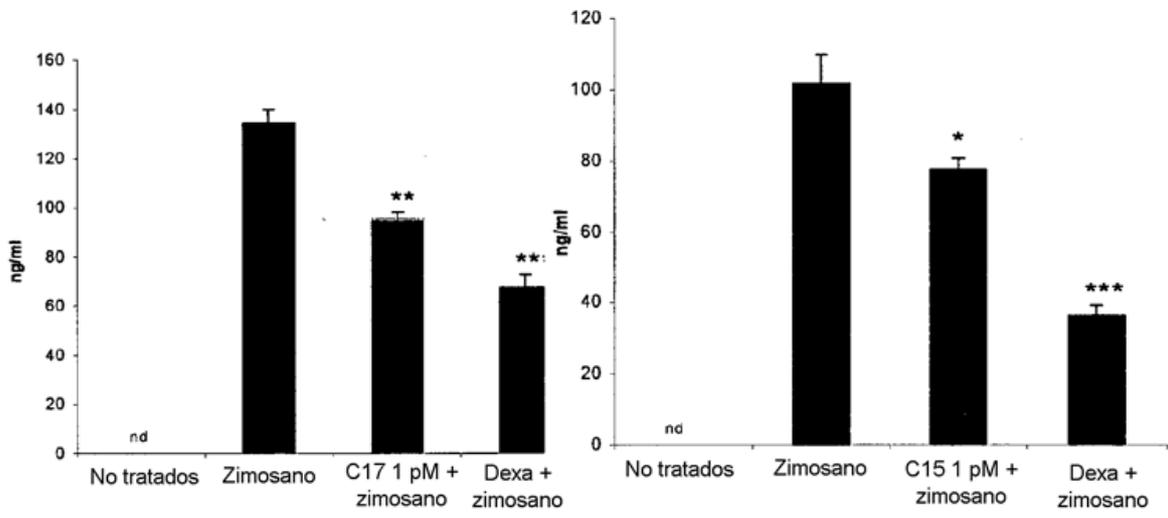


Figura 12

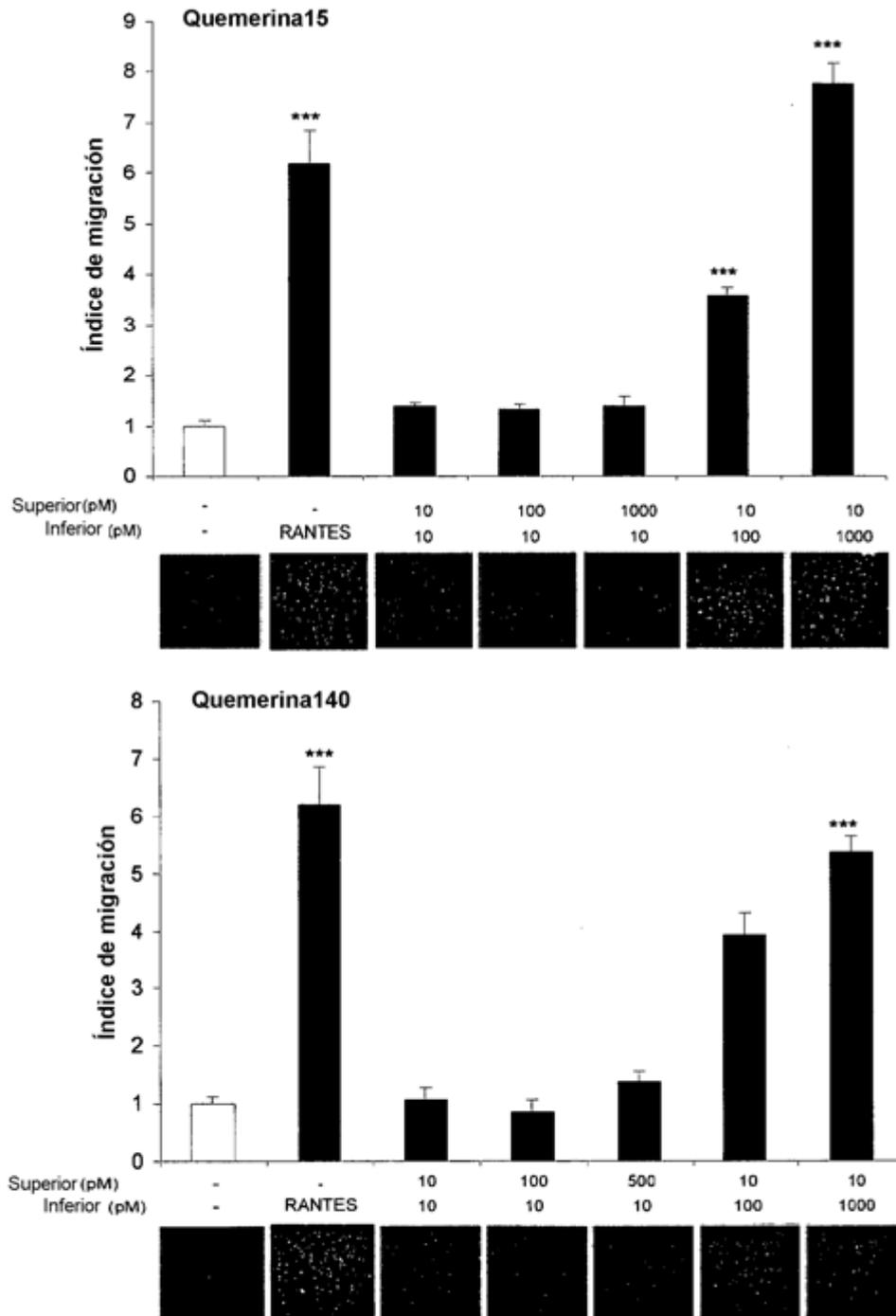


Figura 13

Figura 14

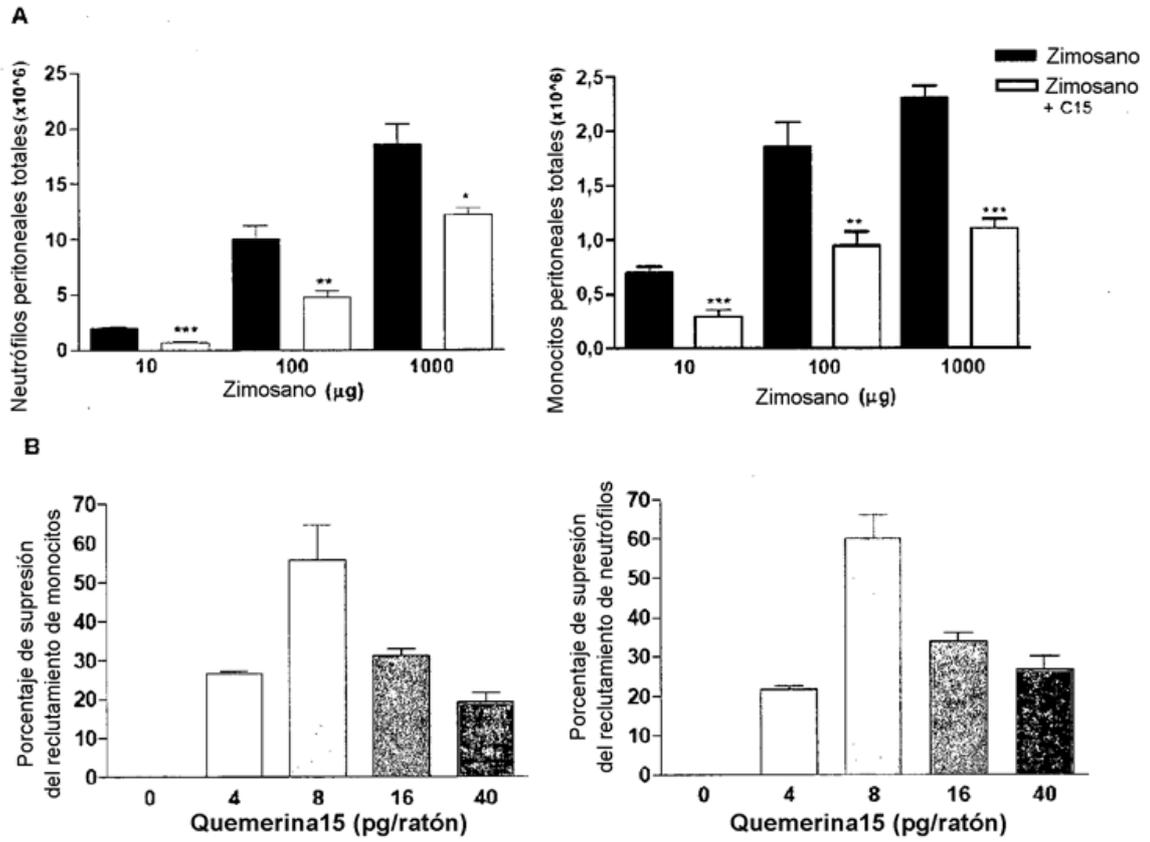


Figura 15

