

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 697**

51 Int. Cl.:

A61K 38/08 (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61P 17/16 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.11.2010 E 10832158 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2015 EP 2512498**

54 Título: **Protección de péptidos contra toxicidad por luz ultravioleta**

30 Prioridad:

19.11.2009 US 262790 P

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

23.11.2015

73 Titular/es:

HELIX BIOMEDIX INC. (100.0%)
22121 17th Avenue SE 112
Bothell, WA 98021, US

72 Inventor/es:

ZHANG, LIJUAN y
FALLA, TIMOTHY J.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 551 697 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

Protección de péptidos contra toxicidad por luz ultravioleta

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a péptidos que tienen actividad biológica y terapéutica. Particularmente, la invención se refiere a péptidos cortos que protegen contra toxicidad celular/tisular inducida por mutágenos. Por ejemplo, los péptidos de la invención protegen contra toxicidad en la piel que sucede después de exposición a luz UV. Una función de los péptidos de la invención es bloquear la fosforilación, y por lo tanto la activación, de ciertas proteínas reguladoras del ciclo celular. La descripción se refiere adicionalmente a métodos para usar los péptidos de la invención para reducir el nivel de toxicidad celular/tisular después de exposición a mutágenos (por ejemplo, luz UV).

15 **Antecedentes de la invención**

Cuando los queratinocitos se exponen a elementos que dañan el ADN (mutágenos) tales como radiación ultravioleta (UV), los puntos de control del ciclo celular se activan bloqueando de ese modo la división celular. La detención del ciclo celular en fase G2 después de daño inducido por mutágenos permite un tiempo para la reparación del ADN. Sin embargo, si el proceso de puntos de control se interrumpe o inhibe, entonces la frecuencia de eventos que producen cáncer (por ejemplo, mutaciones del ADN) se reduce. Esto se ha demostrado que in vitro e in vivo a través de la aplicación de cafeína a la piel antes y después de irradiación UV (Lu et al., 2008, Cancer Res. 68:2523-2529; Heffernan et al., 2009, J. Invest. Dermatol. 129:1805-1815). La base para este fenómeno es que la cafeína inhibe la vía de puntos de control mitótica, que permite a las células con ADN dañado continuar hasta mitosis y morir mediante apoptosis ya que su ADN es incapaz de replicarse satisfactoriamente. Permitiendo el progreso del ciclo celular a pesar de mutación/daño del ADN y la muerte celular apoptótica que sucede como resultado se evita la fijación de mutaciones inducidas por mutágenos en el tejido afectado. Este proceso de ese modo reduce la cantidad de células alteradas genéticamente que por lo contrario tendrían el potencial de desarrollarse en lesiones cancerosas tales como carcinoma.

La capacidad de la cafeína de reducir los efectos carcinogénicos de luz UV en la piel ha creado interés en el uso de este agente en aplicaciones terapéuticas de cuidado de la piel y cuidado cosmético de la piel. Sin embargo, el uso de cafeína en productos de cuidado de la piel es problemático dada su ausencia de especificidad. A parte de sus efectos beneficiosos, la cafeína puede inducir efectos indeseables en la piel (por ejemplo, vasodilatación, sequedad, etc.). Dados estos inconvenientes, se han buscado otros enfoques para prevenir los efectos dañinos de la mutagénesis en piel y tejidos relacionados.

El uso de péptidos cortos para el desarrollo de productos de cuidado de la piel es muy popular debido a su estructura natural basada en aminoácidos, especificidad, ausencia de toxicidad, y ausencia de efectos secundarios. Estas cualidades convierten a los péptidos en un punto de partida adecuado para el desarrollo de nuevos agentes quimiopreventivos para suplementación de las composiciones de cuidado de la piel. Los péptidos que tienen propiedades quimiopreventivas y quimioterapéuticas y que son aplicables para proteger la piel de los efectos dañinos de las luz del sol se describen en este documento.

45 **Sumario de la invención**

La invención se define por las reivindicaciones. Una realización de la presente descripción se refiere a un método para reducir la actividad de una quinasa de punto de control del ciclo celular. Dicho método puede comprender exponer una quinasa de punto de control a un péptido que es de cinco a nueve restos de aminoácido de longitud y comprende la SEC ID N° 13. La quinasa de punto de control del ciclo celular en esta y otras realizaciones puede estar en estado activado. Ejemplos de péptidos que pueden aplicarse en este u otros métodos descritos en este documento comprenden o consisten en las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8, o 10.

Otros ejemplos de péptidos que pueden usarse en los métodos descritos en este documento son aquellos que tienen un resto histidina que es directamente contiguo a la secuencia SEC ID N° 13. Otros péptidos pueden estar amidados en el extremo carboxi terminal de los mismos. Ejemplos específicos de dichos péptidos amidados son aquellos que comprenden o consisten en las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8, o 10.

Las quinasas de punto de control abordadas por los métodos descritos pueden comprender o consistir en la quinasa-1 de punto de control (Chk1) o quinasa-2 de punto de control (Chk2). La quinasa de punto de control puede activarse como resultado de daño en el ADN en una célula. Dicho daño en el ADN puede incurrirse por un agente mutagénico. Ejemplos de agentes mutagénicos son aquellos que son capaces de inducir daño en el ADN en la piel (por ejemplo, radiación ultravioleta). Los métodos descritos también pueden comprender exponer una fosfatasa cdc25 (ciclo 25 de división celular) a un péptido descrito en este documento; cdc25c es un ejemplo de una cdc25c que puede abordarse en la presente invención.

65

Otra realización de la presente descripción se refiere a un método para abordar la piel de un mamífero. Dicho método puede comprender reducir la actividad de una quinasa de punto de control del ciclo celular (por ejemplo, Chk2) en la piel exponiendo la quinasa de punto de control a un péptido descrito. Otra realización de la presente invención se refiere a abordar la piel de un mamífero aplicando un péptido descrito a la piel.

Otra realización de la presente descripción se refiere a un péptido que es de cinco a nueve restos de aminoácido de longitud y comprende la SEC ID N° 13. Ejemplos de dicho péptido comprenden o consisten en las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8, o 10. Otros ejemplos de péptidos de la invención tienen un resto histidina que es directamente contiguo a la secuencia SEC ID N° 13. Otros péptidos pueden estar amidados en el extremo carboxi terminal de los mismos. Ejemplos específicos de dichos péptidos amidados son aquellos que comprenden o consisten en las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8, o 10.

Otra realización de la presente invención se refiere a una composición que comprende un péptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición puede estar en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, polvo, o espuma.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra las secuencias de aminoácidos de ciertos péptidos de la invención (SEC ID N° 1-10) que generalmente se alinean entre sí y la SEC ID N° 11 (tirosinasa humana). Los restos subrayados en ciertos péptidos (SEC ID N° 1-7) constituyen sustituciones conservativas de aminoácidos con respecto a la SEC ID N° 11.

La Fig. 2 muestra la inhibición de la actividad de quinasa 2 de punto de control (Chk2) por estaurosporina o ciertos péptidos de la invención. La actividad Chk2 de control se muestra con la primera barra. Los péptidos mostrados en la figura (SEC ID N° 2-6 y 8-10) están amidados en el extremo carboxi terminal (-CONH₂).

La Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos de Chk2 humana (SEC ID N° 17). Esta secuencia es la misma que la descrita en el sitio web del U.S. National Center for Biotechnological Information (NCBI) (o GenBank) con el número de acceso AAH04207.

La Fig. 4 muestra la secuencia de aminoácidos de Chk1 humana (SEC ID N° 18). Esta secuencia es la misma que la descrita en el sitio web del U.S. National Center for Biotechnological Information (NCBI) (o GenBank) con el número de acceso AAC51736.

La Fig. 5 muestra la secuencia de aminoácidos de cdc25c humano (SEC ID N° 19). Esta secuencia es la misma que la descrita en el sitio web del U.S. National Center for Biotechnological Information (NCBI) (o GenBank) con el número de acceso AAR32098.

Descripción detallada de la invención

Los péptidos descritos (por ejemplo, los enumerados en la Tabla 1 y Figura 1) pueden comprender enantiómeros de L- o D-aminoácidos, conteniendo cada uno restos de una forma enantiomérica o una combinación de ambas formas. Los péptidos pueden estar aumentados o modificados adicionalmente como se describe en los siguientes ejemplos no limitantes, solamente siempre que sus secuencias primarias de aminoácidos estén inalteradas; de este modo, los péptidos consisten en una cierta secuencia de aminoácidos, pero pueden comprender ciertas modificaciones. El extremo carboxi terminal de los péptidos puede ser ácido (-COOH) o estar amidado (por ejemplo, -CONH₂, -CONHR, o -CONR₂). La amidación del extremo carboxi terminal puede volver a los péptidos descritos menos susceptibles a degradación por proteasa y aumentar su solubilidad en comparación con sus formas de ácido libre, proporcionando por lo tanto potencia terapéutica realzada. Los péptidos también pueden lipidarse, lo que proporciona penetración cutánea potenciada. Uno o más de los enlaces moleculares que unen los aminoácidos de cada péptido puede ser un enlace no peptídico. Dichos enlaces no peptídicos incluyen, aunque sin limitación, enlaces imido, éster hidracina, semicarbazoide y azo.

Tabla 1

SEC ID N°	Secuencia
1	DYHTLYQTHL
2	YHSLYQSHL
3	YHSIYQSHI
4	DFHSLFQSH
5	YHSLYESK
6	FHSIYQSH
7	FKSLYQS
8	HSLYQSH
9	HSLYQS

10	SLYQS
13	S-L/I-Y-Q/E-S
14	SIYQS
15	SLYES
16	SIYES

Pueden hacerse diversas modificaciones a los péptidos descritos siempre que se retengan sus secuencias primarias de aminoácidos. Algunas modificaciones pueden usarse para aumentar la potencia del péptido, mientras que otras modificaciones pueden facilitar la manipulación del péptido. Los grupos funcionales peptídicos que normalmente pueden modificarse incluyen grupos hidroxilo, amino, guanidinio, carboxilo, y amida. Normalmente, las reacciones no limitantes de estos grupos incluyen las siguientes: acetilación de grupos hidroxilo por alquil aluros; esterificación, amidación o hidrogenación (es decir, reducción a alcohol) de grupos carboxilo; desamidación, acilación, alquilación, arilación de grupos amino (por ejemplo, grupo amino primario del péptido o el grupo amino de restos de lisina). Las SEC ID N° 1-10 y/o 13, por ejemplo, pueden amidarse en el extremo carboxi terminal (-CONH₂).

A pesar del análisis anterior, los péptidos descritos pueden diseñarse para que tengan ciertas alteraciones de aminoácidos en una o más posiciones de resto de aminoácido. Por ejemplo, se cambian uno, dos, o tres restos a un resto o restos conservados. Las estrategias de conservación de aminoácidos son bien conocidas en la técnica; por ejemplo, es bien sabido que la lisina, fenilalanina, isoleucina, treonina y glutamato pueden sustituirse por, respectivamente, histidina, tirosina, leucina, serina y glutamina sin afectar en gran medida la estructura y función del péptido original. Opcionalmente, el péptido descrito puede tener un aminoácido menos en comparación con una cualquiera de las SEC ID N° 1-10 o 13; o tener dos aminoácidos menos (adyacentes o no adyacentes). Las formas variantes del péptido descrito deben ser al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idénticas a una cualquiera de las SEC ID N° 1-10 o 13. Las formas variantes de los péptidos descritos deben tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, o 95 % de la actividad o función poseída por una cualquiera de las SEC ID N° 1-10 o 13.

Ejemplos de la actividad o función poseída por las SEC ID N° 1-10 y 13 son quimiopreención del cáncer (por ejemplo, carcinoma, sarcoma, melanoma, cáncer cutáneo), prevención del desarrollo de una población de células pre-cancerosas en tejido (por ejemplo, piel) expuesto a un ejemplo mutagénico/carcinogénico (por ejemplo, radiación UV), bloqueo de la detención del ciclo celular y reparación del ADN después de exposición de una célula (por ejemplo una célula cutánea, queratinocito, melanocito, o fibroblasto) a un agente mutagénico/carcinogénico (por ejemplo, radiación UV), bloqueo de la activación de cdc15c por una vía de reparación de daños en el ADN tal como la orquestada a través de una quinasa de punto de control (por ejemplo, quinasa-2 de punto de control [Chk-2]), bloqueo o reducción de la toxicidad (tal como en la piel) relacionada con o inducida por exposición a un mutágeno/carcinógeno (por ejemplo, radiación UV), bloqueo o reducción de los efectos negativos de un mutágeno/carcinógeno sobre las características de la piel sana (por ejemplo, tono, elasticidad, hidratación, coloración, firmeza, suavidad). Quimiopreención (quimioprofilaxis) puede referirse al uso de agentes tales como los péptidos de la invención para reducir el riesgo de, o el retardo en el desarrollo o recidiva de, neoplasia (por ejemplo, cáncer, lesiones pre-cancerosas, lesiones benignas de sobrecrecimiento). La toxicidad en la piel inducida por un agente mutagénico o cualquier otro agente (por ejemplo, agente quimioterapéutico, irritante) puede manifestarse en forma de eritema, alopecia (pérdida de cabello), fotosensibilidad (sensibilidad aumentada a la luz del sol), reacciones de recuerdo (por ejemplo, efectos de quimioterapia en un sitio previamente tratado con radiación), erupciones acneiformes (tipo espinilla), necrosis cutánea, hidradenitis ecrina neutrofílica, metaplasia escamosa ecrina, hiperpigmentación, cambios en las uñas, mucositis, reacciones dérmicas escleróticas, lesión vascular, xerosis, edema (hinchamiento), urticaria, envejecimiento de la piel (por ejemplo, adelgazamiento, elasticidad reducida, arrugas, flaccidez, pigmentación aumentada [por ejemplo, moteado, lentigo solar, hipomelanosis guttata], telangiectasis, angioma, púrpura, comedones solares, milia coloides, queratosis seborreica), formación de ampollas, dermatitis, nódulos vegetativos/fungiformes (bultos sólidos elevados), placas exudativas, úlceras vegetativas o necróticas con pústulas, cicatrización, paniculitis, ulceración, dolor y/o hinchazón. Por "reducción", "inhibición", "bloqueo", o "prevención" como se mencionan en este documento, se entiende que un péptido de la invención disminuye la aparición, gravedad, magnitud, morbilidad, o síntomas asociados una afección en al menos aproximadamente un 7,5 %, 10 %, 12,5 %, 15 %, 17,5 %, 20 %, 22,5 %, 25 %, 27,5 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, o 100 % en comparación con el modo en que la afección existiría normalmente sin la aplicación del péptido o composición que comprende el péptido.

Aunque los péptidos descritos pueden producirse sin la adición de otras secuencias, existe la opinión de incorporar las secuencias descritas dentro de una secuencia más grande. Por ejemplo, un péptido descrito puede tener restos adicionales de aminoácido añadidos a cualquiera de sus extremos o a ambos extremos N- y C-terminal. Un ejemplo sería un epítipo marcador tal como Flag, que se usa habitualmente para rastrear proteínas; epítipos marcadores bien conocidos en la técnica incluyen Myc, His, HA (hemaglutinina), por ejemplo. Por tanto, la presente descripción cubre péptidos que consisten en o comprenden los péptidos de la invención. Aunque los péptidos descritos pueden proporcionarse dentro de una secuencia más grande (es decir, comprendida dentro), la combinación de la secuencia del péptido de la invención con una secuencia o secuencias adicionales no debe constituir ninguna secuencia

5 proteica o peptídica que se exprese de forma natural por una célula animal (por ejemplo, célula humana). Cuando se usa vocabulario en este documento para describir que el péptido "consiste" en una secuencia, dicho péptido, aunque esté limitado a una cierta secuencia de aminoácidos contiguos, puede comprender (es decir, estar conjugada con) restos no aminoácidos u otros péptidos/proteínas (dichos péptidos/proteínas se conjugan con el péptido de la invención mediante un enlace no peptídico).

10 Los péptidos de la presente descripción pueden ser de 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos contiguos de longitud y comprender o consistir en las SEC ID N° 13 (S-L/1-Y-Q/E-S). Ejemplos no limitantes de dichos péptidos son las SEC ID N° 2, 3 y 5-10. Otros ejemplos no limitantes de dichos péptidos son los fragmentos de las SEC ID N° 2, 3 y 5-8 que comprenden la SEC ID N° 13. Siguiendo la fórmula de la SEC ID N° 13, otros péptidos de la presente descripción pueden ser de 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos contiguos de longitud y comprender o consistir en la SEC ID N° 14 (S-I-Y-Q-S), SEC ID N° 15 (S-L-Y-E-S), o SEC ID N° 16 (S-I-Y-E-S). Otros péptidos de la presente descripción pueden comprender la SEC ID N° 13, donde un resto de histidina está directamente contiguo a la secuencia SEC ID N° 13; ejemplos de dichos péptidos son las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 y 9. Péptidos cortos que contienen la SEC ID N° 13 están todos relacionados entre sí a un nivel estructural, dada la similitud estructural/química entre la leucina y la isoleucina (es decir, posición 2 de la SEC ID N° 13) y entre la glutamina y el glutamato (es decir, posición 4 de la SEC ID N° 13). Otros aminoácidos además de leucina e isoleucina pueden ocupar la posición 2 de la SEC ID N° 13, tal como alanina, valina, glicina, o metionina. Otros aminoácidos además de glutamina y glutamato pueden ocupar la posición 4 de la SEC ID N° 13, tal como asparagina, aspartato, arginina, o lisina.

20 Como alternativa, los péptidos de la presente descripción pueden ser de 5, 6, 7, 8, o 9 aminoácidos contiguos de longitud y comprender o consistir en la SEC ID N° 10 (S-L-Y-Q-S). Ejemplos no limitantes de dichos péptidos son las SEC ID N° 2 y 7-9. Otros ejemplos no limitantes de dichos péptidos son fragmentos de las SEC ID N° 2, 7 y 8 que comprenden la SEC ID N° 10. Otros péptidos de la presente invención pueden comprender la SEC ID N° 10, donde un resto de histidina (H) está directamente contiguo a la secuencia SEC ID N° 10; ejemplos de dichos péptidos son las SEC ID N° 2, 8 y 9.

30 Todas las realizaciones de los péptidos de la invención pueden estar en estado "aislado". Por ejemplo, un péptido "aislado" es uno que se ha purificado completa o parcialmente. En algunos casos, el péptido aislado será parte de una composición mayor, sistema de tampón o mezcla de reactivos. En otras circunstancias, el péptido aislado puede estar purificado hasta homogeneidad. Una composición puede comprender el péptido a un nivel de al menos aproximadamente el 50, 80, 90, o 95 % (en una base molar) de todas las demás especies macromoleculares que también están presentes en la misma. Los péptidos de la invención pueden comprender combinaciones heterólogas de componentes. Pueden usarse mezclas de los péptidos de la invención en la práctica de la invención.

35 Los péptidos de la invención pueden conjugarse con moléculas de vehículos solubles o insolubles para modificar sus propiedades de solubilidad según lo necesario y para aumentar las concentraciones locales de péptidos en tejidos diana. Ejemplos de moléculas solubles de vehículo incluyen polímeros de polietilenglicol (PEG) y polivinilpirrolidona; ejemplos de polímeros insolubles incluyen silicatos, poliestireno, y celulosa. Los péptidos también pueden microencapsularse para potenciar su estabilidad durante y después de la aplicación terapéutica; normalmente, se usan poliéster y microesferas de PEG para encapsular y estabilizar los péptidos.

40 Pueden emplearse diversos métodos para preparar microesferas para encapsulación de péptidos dependiendo de la naturaleza hidrófila o hidrófoba de la composición peptídica a encapsular. Ejemplos de protocolos para dichos métodos se encuentran en Wang et al. (J. Control. Release 17:23, 1991) y la patente de Estados Unidos N° 4.324.683. Pueden realizarse estudios de liberación de péptidos *in vitro* para determinar la disponibilidad relativa del péptido después de su incorporación en una microesfera. Las microesferas (200 mg) se suspenden en 2,5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) y agitarse a 37 °C y 100 rpm en una agitadora incubadora ambiental (G-24, New Brunswick Scientific Co., Edison, N.J.). En momentos de muestreo específicos (cada día durante los primeros 4 días y en días alternos después de ello) la solución de tampón se elimina completamente y se reemplaza con PBS fresco. El contenido de péptidos del PBS se mide usando el método de Bradford u otro ensayo cuantitativo adecuado normalmente usado para análisis de proteínas.

45 Los siguientes procedimientos y parámetros se proporcionan solamente con fines de guía y todos son bien conocidos para los especialistas en la técnica. Todos los péptidos descritos pueden sintetizarse usando química convencionales de Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo) en fase sólida en un sintetizador peptídico múltiple Advanced ChemTech Apex 396. El Apex 396 está equipado con un bloque de reacción de 40 pocillos para la producción de hasta 40 péptidos simultáneamente a una escala de 0,15 mmol. Los péptidos pueden prepararse como secuencias amidadas o ácidas libres usando aminoácidos convencionales. La resina primer se lava y se pre-hincha con N,N-dimetilformamida (DMF). El tiempo de hinchamiento es una hora para resinas de amida Rink. El grupo protector Fmoc se retira con piperidina al 25 % en DMF durante 25 minutos, después de lo cual la piperidina se lava completamente de la resina. Para controlar los procesos de racemización, los monómeros de aminoácido Fmoc se pre-activan en una solución equimolar de 1-hidroxi-benzotriazol (HOBt) o 1-hidroxi-7-aza-benzotriazol (HOAt) en DMF 0,5 M. Los acoplamientos amida se realizan usando hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HATU) PyBop® o hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio (HBTU) como agente de activación y un exceso molar de 2,5-5,0 veces de aminoácido en condiciones básicas usando una

base impedida (diisopropiletilamina). Los tiempos de acoplamiento son 1-1,5 horas seguidos de un lavado y reacoplamiento para conseguir un acoplamiento doble o triple antes de la desprotección y la continuación de la cadena peptídica creciente. La eficacia de acoplamiento se controla usando el ensayo convencional de Kaiser. Una vez completada la síntesis peptídica en la resina, el grupo Fmoc final se retira como anteriormente y las secuencias se dejan como la forma de base libre.

La escisión del enlace inestable en ácido del péptido a la resina se consigue usando ácido trifluoroacético (TFA) al 95 % y agua con los eliminadores apropiados añadidos. Después de permitir que la escisión proceda durante aproximadamente 30 minutos a una hora, los péptidos liberados se retiran inmediatamente del bloque de escisión y se transfieren a tubos para la eliminación del TFA a presión reducida. Los péptidos entonces están listos para su purificación y análisis mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) usando una columna C18 en fase inversa y espectrometría de masas. La confirmación de la secuencia primaria y la purificación preparativa se consiguen usando un sistema LC/MS/MS (ABI API2000).

General al protocolo anterior, los péptidos pueden producirse usando cualquier método conocido para los especialistas en la técnica tales como los descritos en Merrifield (J Am Chem Soc. 85:2149, 1963); Carpino et al. (J Org Chem. 51:3732, 1986); Merrifield et al. (Anal Chem. 38:1905, 1966); o Kent et al. [High Yield Chemical Synthesis Of Biologically Active Peptides On An Automated Peptide Synthesizer Of Novel Design, EN: PEPTIDES 1984 (Ragnarsson, ed.) Almquist and Wiksell Int., Stockholm (Suecia), pág. 185-188]. Los péptidos pueden producirse por una máquina con capacidad de adición secuencia de aminoácidos a una cadena peptídica creciente. Sin embargo, los péptidos también pueden fabricarse usando metodología convencional en fase de solución, que puede ser susceptible a esfuerzos de producción a gran escala.

Realizaciones adicionales de la presente invención se refieren a métodos para usar los péptidos descritos anteriormente, tales como en formulaciones o como agentes terapéuticos. Estos métodos pueden implicar el uso de un único péptido, o múltiples péptidos en combinación (es decir, una mezcla).

En ciertos casos, la composición de la invención puede disponerse dentro de dispositivos colocados sobre, en, o bajo la piel. Dichos dispositivos incluyen parches transdérmicos, implantes, e inyecciones que liberan las sustancias de tal modo que contactan con la piel o el folículo capilar por mecanismos de liberación pasiva o activa. La sustancia puede aplicarse, por ejemplo, de forma tópica a la epidermis e intervalos regulares, tal como una o dos veces al día, en un vehículo adecuado y a una concentración eficaz. Una o más inyecciones a la piel ofrecen otra vía para la administración de los péptidos de la invención a la piel o cualquier otro tejido.

Las composiciones usadas para suministrar los péptidos en los métodos descritos en este documento pueden estar en forma de un aerosol, emulsión, líquido, loción, crema, pasta, pomada, polvo, espuma, u otra formulación farmacéuticamente aceptable. Además, los péptidos pueden suministrarse usando formulaciones menos complicadas tales como agua desionizada/destilada, PBS o soluciones salinas médicas convencionales. Generalmente, una formulación farmacéuticamente aceptable incluiría cualquier vehículo adecuado para su uso sobre la piel o superficie mucosa humana. Dichos vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen etanol, dimetilsulfóxido, glicerol, sílice, alúmina, almidón, y vehículos y diluyentes equivalentes. La formulación puede tener opcionalmente atractivo cosmético, y/o contener otros agentes tales como retinoides u otros péptidos que pueden actuar como adyuvantes para la acción terapéutica de los péptidos de la invención. También pueden añadirse antibióticos a la formulación para prevenir infecciones, permitiendo de este modo que suceden procesos de curación máxima. La concentración del péptido en la composición puede ser de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml o de aproximadamente 0,1 µg/ml a aproximadamente 20 µg/ml; sin embargo, la concentración final empleada puede variar fuera de estos intervalos, dependiendo de la naturaleza del tejido diana, la bioactividad del péptido de la invención y el uso de cualquier adyuvante o técnica para obtener absorción potenciada de la composición. Dichas determinaciones pertenecen a las habilidades normales de la técnica. Por ejemplo, la concentración del péptido o péptidos usados en la práctica de la presente invención puede ser de aproximadamente 0,1, 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 200, 500, o 1000 µg/ml.

La administración de los péptidos de la invención y composiciones asociadas puede hacerse a seres humanos y animales, incluyendo todos los mamíferos (por ejemplo, cerdos, vacas, caballos, ovejas, cabras, ratones, ratas, gatos, perros, hurones, primates). La aplicación también puede hacerse en combinación con materiales típicos y/o experimentales tales como injertos de tejido, productos de cultivo tisular, oxígeno y apósitos. En general, la composición puede administrarse de forma tópica, oral, transdérmica, sistémica, o por cualquier otro método conocido para los especialistas en la técnica como útil para suministrar péptidos de la invención al tejido diana. Las composiciones también pueden aplicarse de un modo *in vitro* o *ex vivo*, a células o injertos de paciente que crecen en cultivo, por ejemplo.

Debido a su pequeño tamaño, se espera que los péptidos sean capaces de obtener por sí mismos un nivel de permeabilidad a través de la piel; sin embargo, pueden usarse ciertas técnicas para amplificar este movimiento. Por ejemplo, pueden añadirse grupos lipófilos (no polares) a los péptidos, o los péptidos pueden suministrarse a la piel en un excipiente lipófilo, para potenciar la accesibilidad del péptido a la capa córnea para permitir la translocación a las capas epidérmicas inferiores. De este modo puede considerarse que dichas modificaciones lipófilas tienen un

efecto pro-fármaco. Pueden usarse potenciadores de la permeabilidad tales como disolventes y tensioactivos conocidos en el excipiente para permitir una mejor absorción del péptido. Las técnicas especiales que se prevé que serán útiles en la potenciación del acceso del péptido al tejido/lesión diana incluyen, regímenes de inyección, iontoforesis, electroforesis y ultrasonidos. Un dispositivo iontoforético consiste en dos electrodos sumergidos en una solución de electrolito y colocados sobre la piel. Cuando se aplica una corriente eléctrica a través de los electrodos, se crea un campo eléctrico a través de la capa córnea que dirige el suministro de los péptidos. La electroporación implica la aplicación de impulsos eléctricos de alto voltaje para aumentar la permeabilidad a través de las bicapas lipídicas. Esto difiere de la iontoforesis en la duración e intensidad de la aplicación de corriente eléctrica (la iontoforesis usa un campo eléctrico de bajo voltaje relativamente constante). Se cree que el impulso eléctrico de alto voltaje de la electroporación induce una formación reversible de poros hidrófilos en las membranas de lamelas lipídicas que pueden proporcionar un alto grado de potenciación de la permeabilidad. Los ultrasonidos aplican ondas de sonido que tienen una frecuencia mayor de 16 kHz a la piel, que causa compresión y expansión del tejido a través del cual viajan las ondas de sonido. Las variaciones de presión resultantes causan varios procesos (por ejemplo, cavitación, mezcla, aumento en la temperatura) que pueden potenciar la permeabilidad de los péptidos.

La presente invención puede comprender uno o más inhibidores de proteasa. Puede seleccionarse un inhibidor de proteasa que aborde específicamente proteasas que se esperaría que degradaran el péptido bioactivo seleccionado; dicha selección se determinaría basándose en la longitud y/o secuencia del péptido bioactivo. Sin embargo, los inhibidores de proteasa no necesitan seleccionarse necesariamente de ningún modo específico; por ejemplo, puede emplearse un cóctel de inhibidores de proteasa, que contiene dos o más inhibidores, en la presente invención. Con ciertas realizaciones de la invención, el inhibidor de proteasa no es uno que es específico para inhibir un virus. Pueden incorporarse los siguientes tipos de inhibidores de proteasa en la invención: inhibidores de serina proteasa, inhibidores de cisteína proteasa, inhibidores de aspartato proteasa, inhibidores de metaloproteínasa, inhibidores de tiol proteasa e inhibidores de treonina proteasa.

Los inhibidores de proteasa son bien conocidos en la técnica. Ejemplos no limitantes de inhibidores de proteasa que pueden incorporarse en la presente invención incluyen acetil-pepstatina, clorhidrato de AEBSF (fluoruro de 4-[2-aminoetil] bencenosulfonilo), ALLM (N-Acetil-Leu-Leu-Met), ALLN (N-Acetil-Leu-Leu-Nle-CHO), amastatina (*Streptomyces* sp.), ácido ϵ -amino-n-caproico, inhibidor de aminopeptidasa N, α_1 -antiquimotripsina, antipaina (clorhidrato o diclorhidrato), α_2 -antiplasmina, antitrombina III, α_1 -antitripsina, clorhidrato de *p*-APMSF, aprotinina (por ejemplo, de pulmón bovino), ATBI (un péptido de 11-restos), clorhidrato de benzamidina, bestatina, éster metílico de bestatina, calpastatina, calpeptina, inhibidor de carboxipeptidasa, inhibidor caspasa, inhibidor II de catepsina B, inhibidor I de catepsina G, inhibidor II de catepsina, inhibidor III, inhibidor I de catepsina, inhibidor I de catepsina K, inhibidor II de catepsina K, inhibidor III de catepsina K, inhibidor I de catepsina L, inhibidor II de catepsina L, inhibidor IV de catepsina L, inhibidor V de catepsina L, inhibidor VI de catepsina L, inhibidor de catepsina S, inhibidor de catepsina/subtilisina, quimostatina, inhibidor I de quimotripsina, cistatina, diclorhidrato de 1,5-dansil-glu-gly-arg clorometil cetona, 3,4-dicloroisocoumarina, diisopropilfluorofosfato, inhibidor de dipeptidilpeptidasa II, inhibidor I de dipeptidilpeptidasa IV, inhibidor II de dipeptidilpeptidasa IV, inhibidor de E-64 proteasa, ecotina, sal disódica de EDTA dihidrato, sal tetrasódica de EDTA, EGTA, inhibidor I de elastasa, inhibidor II de elastasa, inhibidor III de elastasa, elastatinal, 6-amidino-2-naftil-4-guanidinobenzoato dimetanosulfonato, glu-gly-arg-clorometil cetona, ácido 2-guanidinoetilmercaptosuccínico, fluoruro de hexadecilsulfonilo, α -yodoacetamida, cininógeno, leuhistina, hemisulfato de leupeptina, α_2 -macroglobulina, ácido DL-2-mercaptometil-3-guanidinoetilpropanoico, pepstatina A, fluoruro de fenilmetilsulfonilo, sal disódica de fosforamidona, sal trifluoroacetato de PPACK II, diclorhidrato de PPACK, inhibidor II de prolil endopeptidasa, clorhidrato de Na-tosil-lys clorometil cetona, Na-tosil-phe clorometil cetona, inhibidor de tripeptidilpeptidasa II, inhibidor de tripsina (de maíz o soja), diclorhidrato de D-val-phe-lys clorometil cetona, 1,3-di-(N-carboxibenzoil-L-leucil-L-leucil)amino acetona, o-fenantrolina, ácido ursólico (por ejemplo, extracto de romero), ácido tranexámico (ácido 4-[aminometil]ciclohexano-1-carboxílico) (clínicamente comercializado como Cyklokapron en Estados Unidos y como Transamin en Asia), Fmoc-Lys(Boc), Fmoc-Arg(Pmc), benzoil-Arg-nitroanilida, benzoil-Arg-naftilamida, y α -2-macroglobulina.

El inhibidor de proteasa usado en la invención puede ser un péptido o proteína, tal como una enzima. Ejemplos no limitantes de dichos inhibidores son las serpinas, que incluyen alfa-1-antitripsina, inhibidor de complemento 1, antitrombina, alfa-1-antiquimotripsina, inhibidor 1 del activador de plasminógeno, y neuroserpina.

Los componentes que se incorporan normalmente en preparaciones de cuidado de la piel son bien conocidos en la técnica. Además del componente peptídico bioactivo, la presente invención puede contener otros agentes activos tales como niacinamida, fitantriol, farnesol, bisabolol y ácido salicílico. Se espera que ciertos agentes activos adicionales actúen de forma sinérgica con el componente peptídico bioactivo, o potencien la vida útil de la formulación.

Cuando la composición es para estar en contacto con piel animal o humana, deben elegirse componentes adicionales que sean adecuados para su aplicación a tejido queratinoso (es decir, estables, baja toxicidad, hipoalergénicos). El CTFA Cosmetic Ingredient Handbook, Segunda Edición (1992), describe una amplia diversidad de ingredientes cosméticos y farmacéuticos no limitantes habitualmente usados en la industria de cuidado de la piel que son adecuados para su uso en las composiciones de la presente invención. Ejemplos de estos ingredientes

5 incluyen: abrasivos, absorbentes, componentes estéticos tales como fragancias, pigmentos, agentes de
 coloración/colorantes, aceites esenciales, sensibilizantes cutáneos, astringentes, etc. (por ejemplo, aceite de clavo,
 mentol, alcanfor, aceite de eucalipto, eugenol, lactato de mentilo, destilado de hamamelis), agentes anti-acné (por
 ejemplo, resorcinol, azufre, ácido salicílico, peróxido de benzilo, eritromicina, zinc), agentes anti-aglomerantes,
 10 agentes antiespumantes, agentes antimicrobianos (por ejemplo, butilcarbamato de yodopropilo), antioxidantes,
 aglutinantes, aditivos biológicos, agentes tamponantes, agentes de aumento de volumen, agentes quelantes,
 aditivos químicos, desnaturalizantes, analgésicos externos, polímeros (por ejemplo, copolímero de eicoseno y
 vinilpirrolidona), agentes opacificantes, ajustadores del pH, propulsores, agentes reductores, secuestrantes, agentes
 de blanqueado y aclarado de la piel (por ejemplo, hidroquinona, ácido kójico, ácido ascórbico [vitamina C], ascorbil
 15 fosfato de magnesio, ascorbil glucosamina), agentes acondicionadores de la piel (por ejemplo, humectantes,
 incluyendo diversos y oclusivos), agentes suavizantes y/o curativos de la piel (por ejemplo, pantenol y derivados [por
 ejemplo, etil pantenol], aloe vera, ácido pantoténico y sus derivados, alantoína, bisabolol, glicirrizinato de dipotasio),
 espesantes, materiales particulados, agentes de estructuración y vitaminas. Muchos de estos agentes se describen
 en detalle en la patente de Estados Unidos N° 6.492.326, específicamente con respecto a las diversas descripciones
 de ingredientes.

Las composiciones de la presente invención pueden contener un material particulado tal como óxido metálico. Estos
 20 particulados pueden estar recubiertos o no recubiertos, cargados o no cargados. Ejemplos no limitantes de
 materiales particulados útiles para preparar la presente invención incluyen oxiclورو de bismuto, óxido de hierro,
 mica, mica tratada con sulfato de bario y TiO₂, sílice, nylon, polietileno, talco, estireno, polipropileno, copolímero de
 etileno/ácido acrílico, sericita, óxido de aluminio, resina de silicona, sulfato de bario, carbonato de calcio, acetato de
 celulosa, dióxido de titanio, polimetilmetacrilato, y mezclas de los mismos. Materiales particulados inorgánicos tales
 como TiO₂, ZnO (óxido de zinc), o ZrO₂ están disponibles en el mercado en varias fuentes. Los materiales
 25 particulados pueden estar presentes en la composición a niveles del 0,01 % al 2 % en peso, o del 0,05 % al 1,5 %
 en peso, o del 0,1 % al 1 % en peso (todas las medidas aproximadas).

Las composiciones de la presente invención pueden contener un agente acondicionador seleccionado entre
 30 humectantes, hidratantes, o acondicionadores de la piel. Pueden emplearse varios de estos materiales y cada uno
 puede estar presente a un nivel de aproximadamente el 0,01 % al 20 %, o de aproximadamente el 0,1 % al 10 %, o
 de aproximadamente el 0,5 % al 7 % en peso de la composición (todas las medidas aproximadas). Estos materiales
 incluyen, aunque sin limitación, guanidina; urea; ácido glicólico y sales de glicolato (por ejemplo, amonio y
 alquilamonio cuaternario); ácido salicílico; ácido láctico y sales de lactato (por ejemplo, amonio y alquilamonio
 35 cuaternario); aloe vera en cualquiera de su diversidad de formas (por ejemplo, gel de aloe vera); polihidroxi
 alcoholes tales como sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, glicerol, hexanotriol, butanotriol, propilenglicol, butilenglicol y
 hexilenglicol; polietilenglicoles; azúcares (por ejemplo, melibiosa) y almidones; derivados de azúcar y almidón (por
 ejemplo, glucosa alcoxilada, fructosa, glucosamina); ácido hialurónico; lactamida monoetanolamina; acetamida
 monoetanolamina; pantenol; alantoína; vaselina; y mezclas de los mismos.

Las composiciones de la presente invención pueden contener un agente de estructuración, que puede usarse para
 40 preparar una emulsión de aceite-en-agua. Sin limitarse a teoría alguna, se cree que el agente de estructuración
 ayuda a proporcionar características reológicas a la composición que contribuyen a la estabilidad de la composición.
 Por ejemplo, el agente de estructuración tiende a ayudar a la formación de estructuras reticulares de gel cristalino
 líquido. El agente de estructuración también puede funcionar como emulsionante o tensioactivo. La presente
 45 invención puede contener de aproximadamente el 0,1 % al 20 %, de aproximadamente el 0,1 % al 10 %, o de
 aproximadamente el 0,5 % al 9 % de uno o más agentes de estructuración en peso de la composición (todas las
 medidas aproximadas).

Los agentes de estructuración que pueden incorporarse en la presente invención se seleccionan entre ácido
 50 esteárico, ácido palmítico, alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, el polietilenglicol éter de alcohol
 estearílico que tiene un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades de óxido de etileno, el
 polietilenglicol éter de alcohol cetílico que tiene un promedio de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 unidades
 de óxido de etileno, y mezclas de los mismos. Otros agentes de estructuración que pueden usarse en la presente
 invención se seleccionan entre alcohol estearílico, alcohol cetílico, alcohol behenílico, el polietilenglicol éter de
 55 alcohol estearílico que tiene un promedio de aproximadamente 2 unidades de óxido de etileno (steareth-2), el
 polietilenglicol éter de alcohol cetílico que tiene un promedio de aproximadamente 2 unidades de óxido de etileno, y
 mezclas de los mismos.

Características, modos de producción y usos adicionales de los péptidos de la invención se describen, por ejemplo,
 60 en las patentes de Estados Unidos N° 6.974.799 y 5.492.894.

Métodos

La presente descripción también puede aprovecharse para un método para inhibir o prevenir el crecimiento
 65 neoplásico en un tejido de un mamífero administrando péptidos descritos en este documento. Aunque no se
 mantiene ningún mecanismo particular de acción, la actividad anti-neoplásica de los péptidos descritos está
 asociada con la capacidad de inhibir la actividad de quinasas de punto de control del ciclo celular tales como la

quinasa-2 de punto de control (Chk2). La inhibición de proteínas Chk, que se activan después de que una célula sufra daño en el ADN, evita que las células entren en detención del ciclo celular, tiempo durante el cual sucede la reparación del ADN. Aunque la reparación del ADN puede devolver a las secuencias a su estado original (es decir, no mutado), habitualmente es insuficiente hacerlo con grandes lesiones genéticas. Con la última situación, el proceso de reparación a menudo fija (hace permanente) las alteraciones genéticas lo que puede contribuir a los procesos oncogénicos (por ejemplo, la activación de un oncogén, la inactivación de un supresor tumoral o gen de control de acceso). Bloqueando o reduciendo la detención del ciclo celular a través de la inhibición de la actividad de proteína Chk, las células pueden continuar hasta la fase mitótica durante la cual, debido a los efectos de alteración de ciertos eventos de daño en el ADN (por ejemplo, roturas de la doble hélice de ADN) en el proceso de división, se induce apoptosis. El daño en el ADN también puede mencionarse como estrés genotóxico. La apoptosis, por lo tanto, elimina células que portan cambios genéticos perjudiciales; dichas células sobrevivirían potencialmente y servirían como precursores para desarrollo neoplásico si se permite que la detención del ciclo celular se active completamente permitiendo de ese modo que suceda la "reparación" del ADN. De este modo, la presente invención puede usarse para reducir la acumulación de mutaciones en un tejido debido a los efectos de agentes que dañan el ADN.

El crecimiento neoplásico prevenido, inhibido, o tratado por los péptidos de la invención puede ser benigno, pre-canceroso, o canceroso (es decir, maligno). Por esta razón puede considerarse que los péptidos descritos tienen actividad quimiopreventiva, quimioprofiláctica, anti-cáncer, anti-neoplásica, anti-carcinogénica, o quimioterapéutica. Con respecto a la prevención o inhibición de un crecimiento o lesión neoplásica en un tejido, puede administrarse uno o más péptidos al tejido que por lo demás no muestra signos obvios (macroscópicos) de neoplasia. Por ejemplo, los péptidos pueden administrarse a un tejido sano antes de que aparezca una lesión mutagénica (por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, o 120 horas antes de la lesión) (por ejemplo, aplicados de forma tópica a la piel antes de exposición al sol), o poco después de padecer la lesión mutagénica (por ejemplo, en 1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 48, 72, 96, o 120 horas después de la lesión) (por ejemplo, aplicados de forma tópica a la piel después de la exposición al sol). Con respecto al cuidado de la piel, los péptidos pueden aplicarse en un protector solar o preparación para después del sol. Los péptidos también pueden usarse para prevenir o inhibir el aumento en las mutaciones en un tejido, esté completamente sano o contenga pequeñas lesiones benignas y/o pre-cancerosas. Dicho uso puede prevenir o inhibir la transición de una lesión benigna o pre-cancerosa en una lesión cancerosa/maligna (es decir, prevenir o inhibir la tumorigénesis), y por tanto puede decirse que trata la lesión benigna o pre-cancerosa. En otro aspecto, la presente invención puede usarse para prevenir o inhibir la hiperplasia en la piel u otro tejido.

Ejemplos de lesiones cutáneas neoplásicas benignas y/o pre-cancerosas cuya aparición que se previene o inhibe por la presente invención, o se tratan, son dermatofibromas, quistes epidérmicos, hemangiomas, manchas planas, linfangiomas, granulomas piogénicos, angiomas aracniformes (nevo de araña), queloides, queratoacantomas, lipomas, lunares, nevo displásico, queratosis seborreica, papiloma cutáneo, hiperplasia sebácea, psoriasis y queratosis actínica (queratosis solar). Ejemplos de lesiones/tumores cutáneos malignos en la skin (es decir, cáncer de piel) cuya aparición se previene o inhibe por la presente invención, o se tratan, son carcinoma de células basales (por ejemplo, carcinoma nodular de células basales, carcinoma quístico de células basales, carcinoma cicatricial de células basales, carcinoma infiltrante de células basales, carcinoma micronodular de células basales, carcinoma superficial de células basales, carcinoma pigmentado de células basales, úlcera roedora [úlcera de Jacobí], fibroepitelioma de Pinkus, carcinoma polipoide de células basales, carcinoma tipo poro de células basales, carcinoma aberrante de células basales), carcinoma de células escamosas (por ejemplo, carcinoma adenoide de células escamosas [carcinoma pseudoglandular de células escamosas], carcinoma de células claras de células escamosas, carcinoma de células fusiformes de células escamosas, carcinoma de células en anillo de sello de células escamosas, carcinoma basaloide de células escamosas, carcinoma verrugoso, queratoacantoma), melanoma (por ejemplo, melanoma lentigo maligno, melanoma de propagación superficial, melanoma lentiginoso acral, melanoma mucoso, melanoma nodular, melanoma polipoide, melanoma desmoplásico, melanoma amelanótico, melanoma de tejido blando, melanoma uveal), dermatofibrosarcoma protuberante, carcinoma de células de Merkel, sarcoma de Kaposi, queratoacantoma, tumores de células fusiformes, carcinomas sebáceos, carcinoma anexial microquístico, fibroxantoma atípico, leiomiosarcoma, y angiosarcoma.

Por consiguiente, la presente invención previene, inhibe, o trata el desarrollo y/o progresión de neoplasias en la piel para las que la célula afectada (es decir, el tipo celular que da lugar a la neoplasia) es una célula epitelial, una célula mesenquimática, un queratinocito, un fibroblasto, un melanocito, una célula madre cutánea, o una célula progenitora cutánea. Los tejidos de la piel abordados por la presente invención son la epidermis, que comprende la capa del estrato basal, la capa del estrato espinoso, la capa del estrato granuloso, la capa del estrato lúcido y la capa del estrato córneo; la dermis, que comprende las capas papilar y reticular; y el tejido subcutáneo, que comprende tejido graso, tejido conectivo, tejido nervioso y vasos sanguíneos. Todos los tejidos, capas y tipos celulares mencionados anteriormente son abordados por la presente invención.

Otros ejemplos de lesiones neoplásicas benignas y/o pre-cancerosas o perfiles de crecimiento cuya aparición se previene o inhibe por la presente invención, o se tratan, son hiperplasia, displasia y metaplasia. Otros ejemplos de lesiones neoplásicas cancerosas que se previenen, inhiben, o tratan por la presente invención son cáncer de pulmón, cáncer óseo, cáncer pancreático, gástrico, cáncer de cabeza o cuello, cáncer de útero, cáncer de ovario,

- cáncer ginecológico, cáncer rectal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer uterino, carcinoma de las trompas de Falopio, cáncer endometrial, cáncer cervical, cáncer vaginal, cáncer de vulva, enfermedad de Hodgkin, cáncer esofágico, cáncer del intestino delgado, cáncer de colon, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula suprarrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de uretra, cáncer de pene, cáncer de próstata, leucemia crónica o aguda, linfomas linfocíticos, cáncer de vejiga, cáncer de riñón o uréter, carcinoma de células renales, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (SNC), linfoma del SNC primario, tumores del eje espinal, cáncer de cerebro, adenoma de la pituitaria, hemangioma, glioma, o blastoma.
- 5
- 10 La presente invención puede ponerse en práctica como un cosmético o en el tratamiento cosmético de la piel. Por consiguiente, la presente invención actúa manteniendo rasgos normales de piel saludable, tales como tono, elasticidad, hidratación, coloración, firmeza y suavidad. Todas estas cualidades pueden degradarse con un aumento en la cantidad de células dañadas en la piel, resultando dichas células dañadas de los efectos de mutágenos y/o la acumulación de mutaciones en la piel. Por consiguiente, la presente invención puede prevenir, inhibir o tratar los efectos del envejecimiento de la piel; el fotoenvejecimiento es un ejemplo, donde la piel envejece parcialmente como una función del grado de exposición a radiación UV. Los efectos del fotoenvejecimiento abordados por la invención son arrugas, manchas y/o hiperpigmentación, piel áspera o correosa, prolapsos/flaccidez, amarilleo, sequedad y diversas neoplasias, por ejemplo.
- 15
- 20 Los tejidos que pueden abordarse en la práctica de la presente invención son la piel y los tejidos mucosos asociados de la piel. Un tejido mucoso asociado de la piel es cualquier tejido organizado de un modo similar a la piel, contiene células epiteliales, y está directamente continuo con la piel. Ejemplos de dichos tejidos son las superficies oral, nasofaríngea, aural, anal y urogenital, así como la conjuntiva palpebral del ojo. Otros tejidos que pueden abordarse en la práctica de la presente invención son aquellos derivados del ectodermo, mesodermo y endodermo, o comprenden células epiteliales, células mesenquimáticas (por ejemplo, fibroblastos), células musculares, o células nerviosas (por ejemplo, neuronas). Otros órganos, sistemas orgánicos y tejidos abordados por la invención son, por ejemplo, el sistema circulatorio (por ejemplo, corazón, sangre, vasos sanguíneos), sistema digestivo (por ejemplo, glándulas salivares, esófago, estómago, hígado, vesícula biliar, páncreas, intestinos delgado y grueso, recto), sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, glándula pituitaria, glándula pineal, tiroides, paratiroides, glándulas suprarrenales), sistema integumentario (por ejemplo, piel, cabello, uñas), sistema linfático (por ejemplo, ganglios y vasos linfáticos), sistema inmune (por ejemplo, amígdalas, adenoides, timo, bazo), sistema muscular (por ejemplo, músculo cardíaco, músculo liso, músculo esquelético), sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, nervios periféricos, nervios), sistema reproductor (por ejemplo, ovarios, trompas de Falopio, útero, vagina, glándulas mamarias, testículos, conducto deferente, vesículas seminales, próstata, pene), sistema respiratorio (por ejemplo, faringe, laringe, tráquea, bronquios, pulmones, diafragma), sistema esquelético (por ejemplo, huesos, cartílago, ligamentos, tendones), y sistema excretor (por ejemplo, riñones, uréteres, vejiga, uretra).
- 25
- 30
- 35
- 40 Como se usa en la práctica de la presente invención, los péptidos descritos pueden actuar limitando la aparición de neoplasias (por ejemplo, hiperplasia) reduciendo la acumulación de mutaciones en un tejido resultante de la exposición a mutágenos de origen endógeno o ectópico (ambiental). El tiempo de exposición a mutágenos puede ser agudo o crónico. En general, la presente invención puede orientarse hacia el bloqueo de la acumulación de mutaciones como resultado de la exposición a mutágenos/carcinógenos ectópicos. Ejemplos de mutágenos ectópicos como se analiza en este documento (es decir, aquellos que se originan en el exterior de un animal desde el entorno adyacente) son radiación ultravioleta (UV) (es decir, luz UV) (UV-A, UV-B, UV-C), radiación ionizante (por ejemplo, rayos X, rayos gamma, partículas alfa), análogos de bases (por ejemplo, 5-bromouracilo), agentes desaminantes (por ejemplo, ácido nitroso [nitrito]), nitroaminas, agentes intercalantes (por ejemplo, bromuro de etidio, proflavina, daunomicina, doxorubicina [adriamicina], talidomida, dactinomicina, aflatoxinas, acridina), agentes alquilantes (por ejemplo, etilnitrosourea), bromo, calor, azida sódica, psoraleno, benceno, benzo-pirenos, arsénico, amianto, cadmio, cromo, óxido de etileno, níquel, radón, cloruro de vinilo, plomo y virus. Ejemplos de mutágenos endógenos son 5-metilcitosina, especies reactivas de oxígeno (por ejemplo, óxido nítrico, superóxido) y transposones. La presente invención también se refiere al bloqueo de la acumulación de mutaciones en un tejido que pueden resultar de la aplicación de ciertos irritantes. Por ejemplo, los irritantes pueden estimular afecciones de inflamación crónica, que pueden conducir a formación de cáncer en diversos tejidos.
- 45
- 50
- 55 Pueden administrarse otros agentes quimiopreventivos y/o antineoplásicos con los péptidos descritos en la práctica de la presente invención. Dicha administración puede incluir un péptido descrito y otro agente quimioprotector juntos en la misma composición, o implicar un esquema donde el péptido y el agente se aplican en diferentes puntos temporales durante el régimen de tratamiento/prevención. Usando tanto un péptido descrito como un agente quimiopreventivo se puede crear actividad quimiopreventiva sinérgica. Ejemplos de agentes quimiopreventivos y/o antineoplásicos que pueden usarse junto con la presente invención son fitoquímicos, cafeína, ácido cafeico, genisteína, resveratrol, sulfuro de dialilo, S-alil cisteína, alicina, licopeno, capsaicina, curcumina, 6-gingerol, ácido elálgico, ácido ursólico, silimarina, anetol, catequinas, emodina, sulforafano, eugenol, isoleugenol, beta-caroteno, oleandrina, polifenoles, indoles (por ejemplo, di-indolilmetano, indol-3-carbinol), isotiocianatos (por ejemplo, fenetilisotiocianato), agentes anti-inflamatorios no esteroideos (NSAID) (por ejemplo, celecoxib, ibuprofeno, sulindaco, aspirina), agonistas de PPAR-gamma (por ejemplo, pioglitazona, rosiglitazona), resiquimod, imiquimod, retinoides (por ejemplo, ácidos todo-trans-retinoico, ácido 9-cis- o 13-cis-retinoico, 4-hidroxitretinamida, bexaroteno,
- 60
- 65

tararoteno, selenio, isoflavonas de soja, estatinas (por ejemplo, atorvastatina), antioxidantes que contienen azufre y análogos de vitamina D (por ejemplo, ergocalciferol, colecalciferol).

5 Un objetivo de infligir daños en el ADN en células cancerosas usando ciertos agentes quimioterapéuticos u otros agentes (por ejemplo, irradiación gamma) es inducir que las células cancerosas experimenten apoptosis efectuando de ese modo regresión tumoral. Sin embargo, la inducción de la detención del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN puede reducir este resultado deseado. Por lo tanto, otro aspecto de la presente invención es usar los péptidos descritos en combinación con un agente de daño del ADN para tratar el cáncer (por ejemplo, un cáncer cutáneo) o cualquier otro tipo de neoplasia. Una base para este método es la capacidad de los péptidos descritos de sensibilizar a células con ADN dañado a apoptosis (es decir, estimular las células para experimentar apoptosis en lugar de detención del ciclo celular, lo que permite que la célula cancerosa sobreviva) como se analiza a continuación. Los agentes de del ADN que pueden usarse en la práctica de la presente invención son, por ejemplo, agentes alquilantes, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucilo, mostazas de nitrógeno, mecloretamina, ifosfamida, melfalán, nitrosoureas, estreptozocina, carmustina (BCNU), lomustina, alquil sulfonatos, busulfán, bendamustina, triazinas, dacarbazina (DTIC), temozolomida, etileniminas, tiotepa, altretamina, hexametilmelamina, antimetabolitos, 6-mercaptopurina, dacarbazina, fludarabina, 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, metotrexato, gemcitabina, citarabina, pemetrexed, arabinosilcitosina, decitabina, antibióticos anti-tumorales, antraciclinas, daunorrubicina, doxorubicina (por ejemplo, Adriamycin®), epirubicina, idarubicina, actinomicina-D, bleomicina, mitomicina-C, neocarzinostatina, mitoxantrona, inhibidores de topoisomerasa, inhibidores de topoisomerasa I, topotecán, irinotecán, inhibidores de topoisomerasa II, etopósido, tenipósido, alcaloides vegetales, taxanos, paclitaxel, docetaxel, epotilonas, ixabepilona, alcaloides de la vinca, vinblastina, vincristina, vinorelbina, estramustina, radiación, rayos gamma, rayos X y radiación UV. Puede aplicarse uno o más de estos agentes a la lesión en combinación con un péptido descrito, o como alternativa, puede ponerse en práctica un esquema donde el péptido y el agente de daño del ADN se aplican en diferentes puntos temporales durante el régimen de tratamiento.

Un aspecto de la presente invención es la inhibición de la actividad de quinasa de punto de control (Chk). Por ejemplo, la invención se refiere a la inhibición de Chk2 que se ha activado por daño en el ADN en una célula de mamífero tal como una célula cutánea. Dicho daño en el ADN y/o actividad Chk puede inducirse, por ejemplo, en una célula mediante exposición a radiación UV o cualquier otro mutágeno presente en el entorno. El daño en el ADN inducido por luz UV generalmente comprende dímeros de ciclobutano pirimidina y productos de 6-4 pirimidina-pirimidona. Aunque sin mantener ninguna teoría o mecanismo particular, Chk se inhibe por la capacidad de los péptidos descritos de bloquear o regular negativamente/modular negativamente su actividad quinasa inhibidora hacia fosfatasa cdc25 (ciclo 25 de división celular) tales como cdc25c. En condiciones celulares normales (poco o ningún daño en el ADN), cdc25c desencadena una cascada de señales que conduce a mitosis, pero en condiciones de daño en el ADN, Chk activada inhibe cdc25c. Por lo tanto, el bloqueo de la actividad Chk aumenta las oportunidades de que cdc25c sea capaz de señalizar para mitosis, incluso en condiciones de daño del ADN que normalmente (es decir, cuando Chk no está inhibida) regularían negativamente cdc25c. Las células con ADN dañado que se dejan entrar en mitosis después se eliminan por apoptosis, dada la incompatibilidad del daño en el ADN con los procesos mitóticos normales. Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se refiere a la inducción de la eliminación de células con ADN dañado mediante apoptosis. Otro aspecto de la presente invención se refiere a la inhibición de la detención del ciclo celular que normalmente sucede en respuesta a daño en el ADN.

Ejemplos de enzimas Chk abordadas por la presente invención son Chk1 y Chk2, ambas cuales son bien conocidas en la técnica. Estas serina/treonina quinasas están estructural y funcionalmente conservadas entre las especies eucariotas, cuya versión humana fosforila la fosfatasa cdc25c humana en la serina-216 (o el resto de serina equivalente, dependiendo de donde esté la secuencia diana de Chk dentro de una variante de cdc25c [por ejemplo, variante de corte y ajuste]). Un método para usar los péptidos de la invención para inhibir la fosforilación mediada por Chk1 y/o Chk2 de cdc25c (por ejemplo, en la posición de la serina-216 o resto de serina equivalente) es parte de la presente invención. La presente invención puede abordar las proteínas Chk como existen de forma natural en células *in vivo*.

Las enzimas Chk activadas (tal como existen en respuesta a daño en el ADN) pueden activarse por fosforilación por factores cadena arriba (por ejemplo, ATM [proteína mutada de ataxia telangiectasia], ATR [proteína relacionada con ATM-RAD3]) en vías de detección de daño en el ADN o mediante autofosforilación. Las formas no activadas de Chk pueden tener poca o ninguna actividad quinasa en comparación con formas activadas de Chk. Las enzimas Chk activadas pueden fosforilar cdc25c, por ejemplo. Sitios de fosforilación ejemplares de Chk2 que pueden activar esta enzima son en las posiciones del resto treonina-26, serina-50, treonina-68, treonina-383 y/o treonina-387 (o posiciones equivalentes de las mismas en una variante de Chk2 [por ejemplo, variante de corte y ajuste]). Sitios ejemplares de fosforilación de Chk1 que pueden activar esta enzima son en las posiciones del resto serina-286, serina-301, serina-317 y/o serina-345 (o posiciones equivalentes de las mismas dentro de la variante de Chk1 [por ejemplo, variante de corte y ajuste]).

Chk2, que está codificada por el gen CHEK2 en seres humanos, tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 3 (SEC ID N° 17). La Chk2 humana también se conoce en la técnica como "homólogo de punto de control de CHK2 (S. pombe)", CDS1, y Rad53. La SEC ID N°17 se presente con fines de referencia solamente, ya que la

Chk2 humana y otras secuencias proteicas de Chk2 de mamífero son conocidas. Por ejemplo, el sitio web del U.S. National Center for Biotechnological Information (NCBI) (o GenBank) describe secuencias de aminoácidos de Chk2 humana con los números de acceso AAH04207, BAB17231, NP_009125, NP_001005735, NP_665861, O96017, AAS58460, AAD48504, AAC83693, EAW59757, EAW59756, EAW59754, CAX11959, CAX11958, CAX11957, CAX14028, CAX14027, CAX14026, CAH73823, CAH73875, AAV41895 y BAF83443, y todas estas secuencias se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. Con fines de poner en práctica la presente invención, Chk2 puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la SEC ID N° 17.

Chk1, que está codificada por el gen CHEK1 en seres humanos, tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 4 (SEC ID N° 18). La Chk1 humana también se conoce en la técnica como "homólogo de punto de control de CHK1 (S. pombe)". La SEC ID N° 18 se presenta con fines de referencia solamente, ya que la Chk1 humana y otras secuencias proteicas de Chk1 de mamífero son conocidas. Por ejemplo, el sitio web del NCBI (o GenBank) describe secuencias de aminoácidos de Chk1 humana con los números de acceso AAC51736, AAW02681, AAH04202, BAF85238, BAA84577, CAB70558, 014757, AAM58752, AAM78553, CAD10662, AAH17575, AAE84492, CAZ65679, AAB88852, ABM83833, ABM87141, AAE67465, AAE67917, AAX36253, BAI45672, NP_001107594 y NP_001265, y todas estas secuencias se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. Con fines de poner en práctica la presente invención, Chk1 puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la SEC ID N° 18.

cdc25c (ciclo de división celular 25C), que es una tirosina fosfatasa, está codificada por el gen CDC25C en seres humanos y tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la Figura 5 (SEC ID N° 19). La cdc25c humana también se conoce en la técnica como "fosfatasa 3 inductora de fase M" y "homólogo C de ciclo de división celular 25 (S. pombe)". La SEC ID N° 19 se presenta con fines de referencia solamente, ya que la cdc25c humana y otras secuencias proteicas de cdc25c de mamífero son conocidas. Por ejemplo, el sitio web del NCBI (o GenBank) describe secuencias de aminoácidos de cdc25c humana con los números de acceso AAR32098, P30307, NP_001781, AAX36531, EAW62145, EAW62149, AAX29802, AAX29802, ABP29523, EAW62148, BAG63273, AAA575741, AAE74714, AAH19089 y AAA35666, y todas estas secuencias se incorporan en este documento por referencia en su totalidad. Con fines de poner en práctica la presente invención, cdc25c puede comprender o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a la SEC ID N° 19.

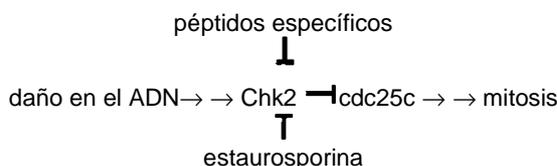
Aunque un aspecto de la presente invención se aprovecha para bloquear la actividad reguladora negativa de Chk2 activada contra cdc25c, asimismo se aprovecha para bloquear la actividad de Chk2 contra una o más de sus otras dianas proteicas. Dianas proteicas adicionales de Chk2 son E2F-1, p53, cdc25a, BRCA-1, PML, Che-1, Hdmx, Trf2, FoxM1, pRB o mdm2, por ejemplo. Además, la invención se aprovecha para bloquear la actividad reguladora negativa de Chk1 contra no solamente cdc25c, sino también p53, cdc25a, cdc25b, Rad51, la proteína de unión a poli-A, aurora-B, quinasa-1 tipo tousled, wee-1 o BLM, por ejemplo.

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas realizaciones de la invención.

Ejemplos

Se realizó un estudio para identificar péptidos cortos aplicables para prevenir o reducir la toxicidad en la piel que puede resultar de la exposición a un mutágeno o irritante. Dados los efectos inhibidores conocidos previos de la cafeína sobre la vía de reparación de daños en el ADN y los efectos anti-neoplásicos de su inhibición en la epidermis, se ensayaron ciertos péptidos relacionados para su capacidad de inhibir de forma simular la vía de reparación de daños en el ADN. Para este fin, se ensayaron péptidos para la capacidad de bloquear el brazo Chk2 (quinasa 2 de punto de control) - cdc25c (proteína homóloga C de ciclo de división celular 25) de la vía de reparación de daños en el ADN.

Chk2, que se activa por proteínas de detección de daños en el ADN, induce detención del ciclo celular por fosforilación y de ese modo inhibición de cdc25c, que es una fosfatasa implicada en la regulación positiva de la actividad quinasa dependiente de ciclina que conduce a mitosis. La interacción de estas proteínas en la vía de reparación de daños en el ADN y su interacción con los agentes analizados a continuación se resumen en el siguiente esquema:



Se desarrollaron péptidos para inhibir la desactivación por Chk2 de cdc25c usando la siguiente metodología. Todos los péptidos se sintetizaron usando química convencional de Fmoc en un sintetizador de peptídico múltiple Advanced ChemTech (Louisville, KY) Apex 396. Después de escisión, los péptidos se purificaron por HPLC usando una columna C-18 en fase inversa y después se analizaron por espectrometría de masas. La confirmación de la secuencia primaria y la purificación preparativa se consiguieron usando un sistema LC/MS/MS (ABI API2000). Todos los péptidos usados en este ejemplo particular (SEC ID N° 2-6 y 8-10) estaban amidados en el extremo carboxi-terminal (-CONH₂).

Se midió la actividad inhibidora de las SEC ID N° 2-6 y 8-10 sobre la fosforilación por Chk2 de cdc25c usando el kit de actividad punto de control K-LISA™ disponible en Calbiochem/EMD Biosciences (San Diego, CA) según las instrucciones del fabricante. La enzima Chk2 humana activada para estos ensayos se obtuvo de Sigma (St. Louis, MO). El inhibidor de quinasa general, estaurosporina (10 μM de concentración final) se usó como control positivo para la inhibición de la actividad Chk2. Se incubaron péptidos de ensayo individuales (SEC ID N° 2-6, 8-10) con Chk2 a una concentración final de 50 μg/ml. En resumen, el ensayo K-LISA™ utilizó un sustrato peptídico biotinilado (KKKVSRSGLYRSPSPENLNRPR, SEC ID N° 12) que puede fosforilarse en la tercera serina por Chk2 (también puede fosforilarse por la proteína Chk1). Este sustrato sirvió como sustituto para cdc25c, ya que la SEC ID N° 12 contiene la secuencia diana para fosforilación de serina por Chk2.

El sustrato peptídico biotinilado y la muestra que contenía Chk2 con o sin agentes añadidos (estaurosporina o una de las SEC ID N° 2-6, 8-10) se incubaron en presencia de ATP en pocillos de una placa de 96 pocillos recubiertos con estreptavidina. Esta incubación permitió la fosforilación del sustrato por Chk2 y la captura del sustrato en una única etapa. Después de la incubación, el sustrato fosforilado se detectó usando un anticuerpo primario anti-fosfoserina, un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano rusticano (HRP) y sustrato TMB (tetrametilbenzidina) para desarrollo de color (los anticuerpos primario y secundario, y TMB, se proporcionaron en el kit K-LISA™). La sensibilidad del ensayo se aumentó mediante la adición de la solución Stop proporcionada en el kit. Se determinó la actividad Chk2 relativa leyendo la absorbancia de cada pocillo a longitudes de onda duales de 450/540 nm.

Las SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 y 10 inhibieron todas la actividad de Chk2 contra el péptido sustrato (Figura 2). Por ejemplo, la SEC ID N° 10 redujo la actividad de fosforilación de Chk2 en aproximadamente un 48 %, que se aproximó a la actividad inhibidora mostrada por estaurosporina (aproximadamente el 69 %). Las SEC ID N° 5, 6 y 8 tuvieron una capacidad similar para inhibir Chk2. Globalmente, estos datos indican que ciertos péptidos pueden reducir la actividad Chk2 hacia su sustrato (es decir, cdc25c), lo que indica adicionalmente una capacidad de reducir el nivel de detención del ciclo celular que se iniciaría *in vivo* tras exposición celular a agentes de daño del ADN.

Todas las composiciones o métodos descritos y reivindicados en este documento pueden prepararse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta invención se han descrito en términos de ciertas realizaciones, será evidente para los especialistas en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descritos en este documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Falla, Timothy J. Zhang, Lijuan

<120> PROTECCIÓN DE PÉPTIDOS CONTRA TOXICIDAD POR LUZ ULTRAVIOLETA

<130> 11181.0043.00PC00

<150> US Provisional 61/262.790

<151> 19-11-2009

<160> 19

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Asp Tyr His Thr Leu Tyr Gln Thr His Leu
1 5 10

ES 2 551 697 T3

<210> 2
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <400> 2

 Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His Leu
 1 5

 10
 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15
 <400> 3

 Tyr His Ser Ile Tyr Gln Ser His Ile
 1 5

 20
 <210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 25
 <400> 4

 Asp Phe His Ser Leu Phe Gln Ser His
 1 5

 30
 <210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 5

 Tyr His Ser Leu Tyr Glu Ser Lys
 1 5

 35
 <210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <400> 6

 Phe His Ser Ile Tyr Gln Ser His
 1 5

 45
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 50
 <400> 7

 Phe Lys Ser Leu Tyr Gln Ser
 1 5

 55
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 551 697 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 8

5

His Ser Leu Tyr Gln Ser His
1 5

<210> 9

<211> 6

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 9

15

His Ser Leu Tyr Gln Ser
1 5

<210> 10

<211> 5

20

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

25

Ser Leu Tyr Gln Ser
1 5

<210> 11

<211> 529

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 11

ES 2 551 697 T3

Met Leu Leu Ala Val Leu Tyr Cys Leu Leu Trp Ser Phe Gln Thr Ser
 1 5 10 15

Ala Gly His Phe Pro Arg Ala Cys Val Ser Ser Lys Asn Leu Met Glu
 20 25 30

Lys Glu Cys Cys Pro Pro Trp Ser Gly Asp Arg Ser Pro Cys Gly Gln
 35 40 45

Leu Ser Gly Arg Gly Ser Cys Gln Asn Ile Leu Leu Ser Asn Ala Pro
 50 55 60

Leu Gly Pro Gln Phe Pro Phe Thr Gly Val Asp Asp Arg Glu Ser Trp
 65 70 75 80

Pro Ser Val Phe Tyr Asn Arg Thr Cys Gln Cys Ser Gly Asn Phe Met
 85 90 95

Gly Phe Asn Cys Gly Asn Cys Lys Phe Gly Phe Trp Gly Pro Asn Cys
 100 105 110

Thr Glu Arg Arg Leu Leu Val Arg Arg Asn Ile Phe Asp Leu Ser Ala
 115 120 125

Pro Glu Lys Asp Lys Phe Phe Ala Tyr Leu Thr Leu Ala Lys His Thr
 130 135 140

Ile Ser Ser Asp Tyr Val Ile Pro Ile Gly Thr Tyr Gly Gln Met Lys
 145 150 155 160

Asn Gly Ser Thr Pro Met Phe Asn Asp Ile Asn Ile Tyr Asp Leu Phe
 165 170 175

ES 2 551 697 T3

Val Trp Met His Tyr Tyr Val Ser Met Asp Ala Leu Leu Gly Gly Tyr
 180 185 190

Glu Ile Trp Arg Asp Ile Asp Phe Ala His Glu Ala Pro Ala Phe Leu
 195 200 205

Pro Trp His Arg Leu Phe Leu Leu Arg Trp Glu Gln Glu Ile Gln Lys
 210 215 220

Leu Thr Gly Asp Glu Asn Phe Thr Ile Pro Tyr Trp Asp Trp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Glu Lys Cys Asp Ile Cys Thr Asp Glu Tyr Met Gly Gly Gln His
 245 250 255

Pro Thr Asn Pro Asn Leu Leu Ser Pro Ala Ser Phe Phe Ser Ser Trp
 260 265 270

Gln Ile Val Cys Ser Arg Leu Glu Glu Tyr Asn Ser His Gln Ser Leu
 275 280 285

Cys Asn Gly Thr Pro Glu Gly Pro Leu Arg Arg Asn Pro Gly Asn His
 290 295 300

Asp Lys Ser Arg Thr Pro Arg Leu Pro Ser Ser Ala Asp Val Glu Phe
 305 310 315 320

Cys Leu Ser Leu Thr Gln Tyr Glu Ser Gly Ser Met Asp Lys Ala Ala
 325 330 335

Asn Phe Ser Phe Arg Asn Thr Leu Glu Gly Phe Ala Ser Pro Leu Thr
 340 345 350

Gly Ile Ala Asp Ala Ser Gln Ser Ser Met His Asn Ala Leu His Ile
 355 360 365

Tyr Met Asn Gly Thr Met Ser Gln Val Gln Gly Ser Ala Asn Asp Pro
 370 375 380

Ile Phe Leu Leu His His Ala Phe Val Asp Ser Ile Phe Glu Gln Trp
 385 390 395 400

Leu Arg Arg His Arg Pro Leu Gln Glu Val Tyr Pro Glu Ala Asn Ala
 405 410 415

Pro Ile Gly His Asn Arg Glu Ser Tyr Met Val Pro Phe Ile Pro Leu
 420 425 430

Tyr Arg Asn Gly Asp Phe Phe Ile Ser Ser Lys Asp Leu Gly Tyr Asp
 435 440 445

Tyr Ser Tyr Leu Gln Asp Ser Asp Pro Asp Ser Phe Gln Asp Tyr Ile
 450 455 460

ES 2 551 697 T3

Lys Ser Tyr Leu Glu Gln Ala Ser Arg Ile Trp Ser Trp Leu Leu Gly
 465 470 475 480

Ala Ala Met Val Gly Ala Val Leu Thr Ala Leu Leu Ala Gly Leu Val
 485 490 495

Ser Leu Leu Cys Arg His Lys Arg Lys Gln Leu Pro Glu Glu Lys Gln
 500 505 510

Pro Leu Leu Met Glu Lys Glu Asp Tyr His Ser Leu Tyr Gln Ser His
 515 520 525

Leu

5 <210> 12
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> sustrato quinasa

<400> 12

Lys Lys Lys Val Ser Arg Ser Gly Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro
 1 5 10 15

Glu Asn Leu Asn Arg Pro Arg
 20

15 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> SITIO
 <222> (2)..(2)
 <223> Leu o Ile

25 <220>
 <221> SITIO
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln o Glu

30 <400> 13

Ser Xaa Tyr Xaa Ser
 1 5

35 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40 <400> 14

Ser Ile Tyr Gln Ser
 1 5

45 <210> 15
 <211> 5
 <212> PRT

ES 2 551 697 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ser Leu Tyr Glu Ser
1 5

5

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 16

Ser Ile Tyr Glu Ser
1 5

15

<210> 17

<211> 543

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<400> 17

Met Ser Arg Glu Ser Asp Val Glu Ala Gln Gln Ser His Gly Ser Ser
1 5 10 15

Ala Cys Ser Gln Pro His Gly Ser Val Thr Gln Ser Gln Gly Ser Ser
20 25 30

Ser Gln Ser Gln Gly Ile Ser Ser Ser Ser Thr Ser Thr Met Pro Asn
35 40 45

Ser Ser Gln Ser Ser His Ser Ser Ser Gly Thr Leu Ser Ser Leu Glu
50 55 60

Thr Val Ser Thr Gln Glu Leu Tyr Ser Ile Pro Glu Asp Gln Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Gln Glu Pro Glu Glu Pro Thr Pro Ala Pro Trp Ala Arg Leu

ES 2 551 697 T3

				85					90				95			
Trp	Ala	Leu	Gln	Asp	Gly	Phe	Ala	Asn	Leu	Glu	Cys	Val	Asn	Asp	Asn	
			100					105					110			
Tyr	Trp	Phe	Gly	Arg	Asp	Lys	Ser	Cys	Glu	Tyr	Cys	Phe	Asp	Glu	Pro	
		115					120					125				
Leu	Leu	Lys	Arg	Thr	Asp	Lys	Tyr	Arg	Thr	Tyr	Ser	Lys	Lys	His	Phe	
	130					135					140					
Arg	Ile	Phe	Arg	Glu	Val	Gly	Pro	Lys	Asn	Ser	Tyr	Ile	Ala	Tyr	Ile	
145					150					155					160	
Glu	Asp	His	Ser	Gly	Asn	Gly	Thr	Phe	Val	Asn	Thr	Glu	Leu	Val	Gly	
				165					170					175		
Lys	Gly	Lys	Arg	Arg	Pro	Leu	Asn	Asn	Asn	Ser	Glu	Ile	Ala	Leu	Ser	
			180					185					190			
Leu	Ser	Arg	Asn	Lys	Val	Phe	Val	Phe	Phe	Asp	Leu	Thr	Val	Asp	Asp	
		195					200					205				
Gln	Ser	Val	Tyr	Pro	Lys	Ala	Leu	Arg	Asp	Glu	Tyr	Ile	Met	Ser	Lys	
	210					215					220					
Thr	Leu	Gly	Ser	Gly	Ala	Cys	Gly	Glu	Val	Lys	Leu	Ala	Phe	Glu	Arg	
225					230					235					240	
Lys	Thr	Cys	Lys	Lys	Val	Ala	Ile	Lys	Ile	Ile	Ser	Lys	Arg	Lys	Phe	
				245					250					255		
Ala	Ile	Gly	Ser	Ala	Arg	Glu	Ala	Asp	Pro	Ala	Leu	Asn	Val	Glu	Thr	
			260					265					270			
Glu	Ile	Glu	Ile	Leu	Lys	Lys	Leu	Asn	His	Pro	Cys	Ile	Ile	Lys	Ile	
		275					280					285				
Lys	Asn	Phe	Phe	Asp	Ala	Glu	Asp	Tyr	Tyr	Ile	Val	Leu	Glu	Leu	Met	
	290					295					300					
Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Phe	Asp	Lys	Val	Val	Gly	Asn	Lys	Arg	Leu	Lys	
305					310					315					320	
Glu	Ala	Thr	Cys	Lys	Leu	Tyr	Phe	Tyr	Gln	Met	Leu	Leu	Ala	Val	Gln	
				325					330					335		
Tyr	Leu	His	Glu	Asn	Gly	Ile	Ile	His	Arg	Asp	Leu	Lys	Pro	Glu	Asn	
			340					345					350			
Val	Leu	Leu	Ser	Ser	Gln	Glu	Glu	Asp	Cys	Leu	Ile	Lys	Ile	Thr	Asp	
		355					360					365				
Phe	Gly	His	Ser	Lys	Ile	Leu	Gly	Glu	Thr	Ser	Leu	Met	Arg	Thr	Leu	
						375					380					

ES 2 551 697 T3

Cys Gly Thr Pro Thr Tyr Leu Ala Pro Glu Val Leu Val Ser Val Gly
 385 390 395 400
 Thr Ala Gly Tyr Asn Arg Ala Val Asp Cys Trp Ser Leu Gly Val Ile
 405 410 415
 Leu Phe Ile Cys Leu Ser Gly Tyr Pro Pro Phe Ser Glu His Arg Thr
 420 425 430
 Gln Val Ser Leu Lys Asp Gln Ile Thr Ser Gly Lys Tyr Asn Phe Ile
 435 440 445
 Pro Glu Val Trp Ala Glu Val Ser Glu Lys Ala Leu Asp Leu Val Lys
 450 455 460
 Lys Leu Leu Val Val Asp Pro Lys Ala Arg Phe Thr Thr Glu Glu Ala
 465 470 475 480
 Leu Arg His Pro Trp Leu Gln Asp Glu Asp Met Lys Arg Lys Phe Gln
 485 490 495
 Asp Leu Leu Ser Glu Glu Asn Glu Ser Thr Ala Leu Pro Gln Val Leu
 500 505 510
 Ala Gln Pro Ser Thr Ser Arg Lys Arg Pro Arg Glu Gly Glu Ala Glu
 515 520 525
 Gly Ala Glu Thr Thr Lys Arg Pro Ala Val Cys Ala Ala Val Leu
 530 535 540

<210> 18
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 18

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

5

10

ES 2 551 697 T3

Glu Pro Asp Ile Gly Met Pro Glu Pro Asp Ala Gln Arg Phe Phe His
 100 105 110
 Gln Leu Met Ala Gly Val Val Tyr Leu His Gly Ile Gly Ile Thr His
 115 120 125
 Arg Asp Ile Lys Pro Glu Asn Leu Leu Leu Asp Glu Arg Asp Asn Leu
 130 135 140
 Lys Ile Ser Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Phe Arg Tyr Asn Asn Arg
 145 150 155 160
 Glu Arg Leu Leu Asn Lys Met Cys Gly Thr Leu Pro Tyr Val Ala Pro
 165 170 175
 Glu Leu Leu Lys Arg Arg Glu Phe His Ala Glu Pro Val Asp Val Trp
 180 185 190
 Ser Cys Gly Ile Val Leu Thr Ala Met Leu Ala Gly Glu Leu Pro Trp
 195 200 205
 Asp Gln Pro Ser Asp Ser Cys Gln Glu Tyr Ser Asp Trp Lys Glu Lys
 210 215 220
 Lys Thr Tyr Leu Asn Pro Trp Lys Lys Ile Asp Ser Ala Pro Leu Ala
 225 230 235 240
 Leu Leu His Lys Ile Leu Val Glu Asn Pro Ser Ala Arg Ile Thr Ile
 245 250 255
 Pro Asp Ile Lys Lys Asp Arg Trp Tyr Asn Lys Pro Leu Lys Lys Gly
 260 265 270
 Ala Lys Arg Pro Arg Val Thr Ser Gly Gly Val Ser Glu Ser Pro Ser
 275 280 285
 Gly Phe Ser Lys His Ile Gln Ser Asn Leu Asp Phe Ser Pro Val Asn
 290 295 300
 Ser Ala Ser Ser Glu Glu Asn Val Lys Tyr Ser Ser Ser Gln Pro Glu
 305 310 315 320
 Pro Arg Thr Gly Leu Ser Leu Trp Asp Thr Ser Pro Ser Tyr Ile Asp
 325 330 335
 Lys Leu Val Gln Gly Ile Ser Phe Ser Gln Pro Thr Cys Pro Asp His
 340 345 350
 Met Leu Leu Asn Ser Gln Leu Leu Gly Thr Pro Gly Ser Ser Gln Asn
 355 360 365
 Pro Trp Gln Arg Leu Val Lys Arg Met Thr Arg Phe Phe Thr Lys Leu
 370 375 380

ES 2 551 697 T3

Asp Ala Asp Lys Ser Tyr Gln Cys Leu Lys Glu Thr Cys Glu Lys Leu
 385 390 395 400

Gly Tyr Gln Trp Lys Lys Ser Cys Met Asn Gln Val Thr Ile Ser Thr
 405 410 415

Thr Asp Arg Arg Asp Asn Lys Leu Ile Phe Lys Val Asn Leu Leu Glu
 420 425 430

Met Asp Asp Lys Ile Leu Val Asp Phe Arg Leu Ser Lys Gly Asp Gly
 435 440 445

Leu Glu Phe Lys Arg His Phe Leu Lys Ile Lys Gly Lys Leu Ile Asp
 450 455 460

Ile Val Ser Ser Gln Lys Val Trp Leu Pro Ala Thr
 465 470 475

<210> 19
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 19

Met Ser Thr Glu Leu Phe Ser Ser Thr Arg Glu Glu Gly Ser Ser Gly
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Ser Phe Arg Ser Asn Gln Arg Lys Met Leu Asn Leu Leu
 20 25 30

Leu Glu Arg Asp Thr Ser Phe Thr Val Cys Pro Asp Val Pro Arg Thr
 35 40 45

Pro Val Gly Lys Phe Leu Gly Asp Ser Ala Asn Leu Ser Ile Leu Ser
 50 55 60

Gly Gly Thr Pro Lys Arg Cys Leu Asp Leu Ser Asn Leu Ser Ser Gly
 65 70 75 80

Glu Ile Thr Ala Thr Gln Leu Thr Thr Ser Ala Asp Leu Asp Glu Thr
 85 90 95

Gly His Leu Asp Ser Ser Gly Leu Gln Glu Val His Leu Ala Gly Met
 100 105 110

Asn His Asp Gln His Leu Met Lys Cys Ser Pro Ala Gln Leu Leu Cys
 115 120 125

Ser Thr Pro Asn Gly Leu Asp Arg Gly His Arg Lys Arg Asp Ala Met
 130 135 140

Cys Ser Ser Ser Ala Asn Lys Glu Asn Asp Asn Gly Asn Leu Val Asp
 145 150 155 160

10

ES 2 551 697 T3

Ser Glu Met Lys Tyr Leu Gly Ser Pro Ile Thr Thr Val Pro Lys Leu
165 170 175

Asp Lys Asn Pro Asn Leu Gly Glu Asp Gln Ala Glu Glu Ile Ser Asp
180 185 190

Glu Leu Met Glu Phe Ser Leu Lys Asp Gln Glu Ala Lys Val Ser Arg
195 200 205

Ser Gly Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu Asn Arg Pro
210 215 220

Arg Leu Lys Gln Val Glu Lys Phe Lys Asp Asn Thr Ile Pro Asp Lys
225 230 235 240

Val Lys Lys Lys Tyr Phe Ser Gly Gln Gly Lys Leu Arg Lys Gly Leu
245 250 255

Cys Leu Lys Lys Thr Val Ser Leu Cys Asp Ile Thr Ile Thr Gln Met
260 265 270

Leu Glu Glu Asp Ser Asn Gln Gly His Leu Ile Gly Asp Phe Ser Lys
275 280 285

Val Cys Ala Leu Pro Thr Val Ser Gly Lys His Gln Asp Leu Lys Tyr
290 295 300

Val Asn Pro Glu Thr Val Ala Ala Leu Leu Ser Gly Lys Phe Gln Gly
305 310 315 320

Leu Ile Glu Lys Phe Tyr Val Ile Asp Cys Arg Tyr Pro Tyr Glu Tyr
325 330 335

Leu Gly Gly His Ile Gln Gly Ala Leu Asn Leu Tyr Ser Gln Glu Glu
340 345 350

Leu Phe Asn Phe Phe Leu Lys Lys Pro Ile Val Pro Leu Asp Thr Gln
355 360 365

Lys Arg Ile Ile Ile Val Phe His Cys Glu Phe Ser Ser Glu Arg Gly
370 375 380

Pro Arg Met Cys Arg Cys Leu Arg Glu Glu Asp Arg Ser Leu Asn Gln
385 390 395 400

Tyr Pro Ala Leu Tyr Tyr Pro Glu Leu Tyr Ile Leu Lys Gly Gly Tyr
405 410 415

Arg Asp Phe Phe Pro Glu Tyr Met Glu Leu Cys Glu Pro Gln Ser Tyr
420 425 430

Cys Pro Met His His Gln Asp His Lys Thr Glu Leu Leu Arg Cys Arg
435 440 445

Ser Gln Ser Lys Val Gln Glu Gly Glu Arg Gln Leu Arg Glu Gln Ile
450 455 460

Ala Leu Leu Val Lys Asp Met Ser Pro
465 470

REIVINDICACIONES

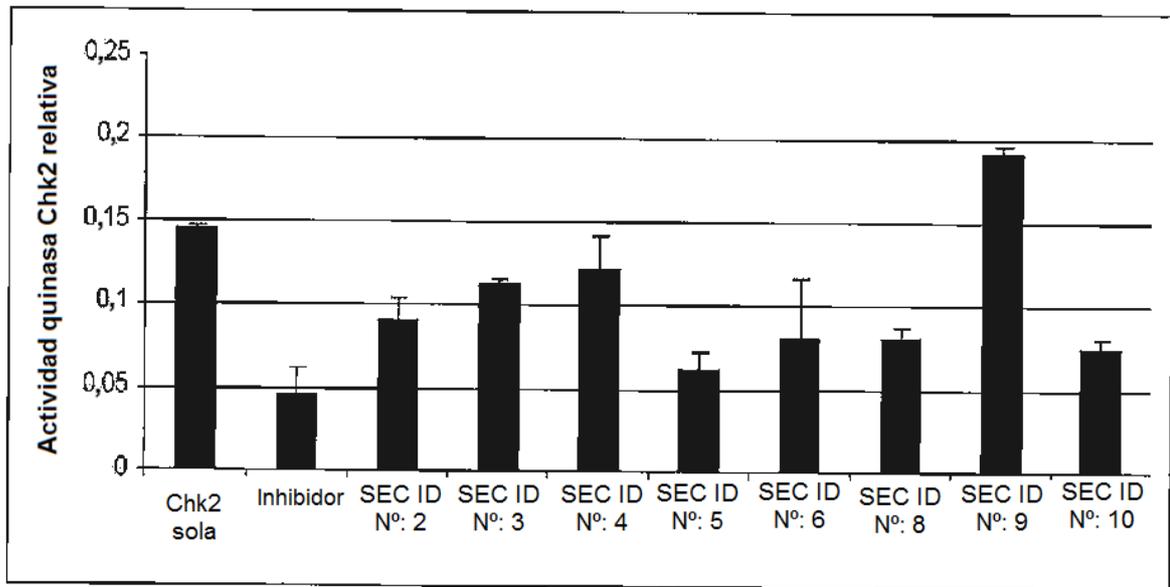
1. Un péptido compuesto por la secuencia de las SEC ID N° 3, 5, 6, 8 o 10.
- 5 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dicho péptido es la SEC ID N° 10.
3. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido es un ácido libre o está amidado en su extremo carboxi terminal.
- 10 4. Una composición que comprende un péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
5. La composición de la reivindicación 4, en donde la composición está en forma de un aerosol, una emulsión, un líquido, una loción, una crema, una pasta, una pomada, un polvo o una espuma.
- 15 6. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 para su uso en tratamiento del cuidado de la piel.
7. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 para su uso en el mantenimiento de rasgos de piel sana tales como tono, elasticidad, hidratación, coloración, firmeza y suavidad.
- 20 8. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 para su uso en el tratamiento de los efectos del fotoenvejecimiento de la piel tales como arrugas, manchas y/o hiperpigmentación, piel áspera o correosa, prolapso o flaccidez de la piel, amarilleo, sequedad y neoplasias cutáneas.
- 25 9. Una composición de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5 o un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en: SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10 para su uso como un medicamento.
10. Un péptido para su uso en la reducción o la prevención de toxicidad tisular de la piel inducida por mutágenos asociada a la actividad de una quinasa de punto de control del ciclo celular activada, en donde dicha secuencia peptídica es la SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10.
- 30 11. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde dicha toxicidad tisular de la piel es en forma de cáncer cutáneo, lesiones pre-cancerosas, eritema, alopecia, fotosensibilidad, reacciones de recuerdo, formación de ampollas, necrosis cutánea, acneiforme, xerosis, pigmentación aumentada, dermatitis o úlceras cutáneas.
- 35 12. Un péptido para su uso en el tratamiento de la piel de un mamífero para reducir la toxicidad asociada a exposición a luz ultravioleta, en donde dicha secuencia peptídica es la SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10.
- 40 13. Un péptido para su uso en el tratamiento de piel dañada por exposición a luz UV o para el mantenimiento de una piel sana, en donde dicha secuencia peptídica es la SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10.
14. El uso no terapéutico de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en: SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10 como un producto cosmético.
- 45 15. Un producto cosmético que comprende un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en: SEC ID N° 2, 3, 5, 6, 8 o 10.

SEC ID N°:11

1 mllavlyc11 wsfqtsaghf pracvssknl mekeccppws gdrspcgqls grgscqnill
61 snaplgpqqfp ftgvddresw psvfynrtcq csgnfmqfnc gncckfgfwgp ncterrllvr
121 rnifdlsape kdkffayltl akhtissdyv ipigtygqak ngstpmfndi niydlfwwmh
181 yyvsmdallg gyeiwrdidf aheapaf1pw hrlflrweq eiqlktgden ftipywdwrd
241 aekcdictde ymqqqhptnp nllspasffs swqivcsrle eynshqslcn gtpegplrnr
301 pgnhdksrtp rlpssadvef clsltqyesg smdkaanfsf rntlegfasp ltgiadasqs
361 smbnalhiym ngtnsqvqgs andpifllhh afvdsifeqw lrrhrplqev ypeanapigh
421 nresymvpfi plyrngdffi sskdlgydys ylgdsdpdsf qdyiksyleq asriwswllg
481 aamvgav1ta llaglvsl1c rhkrkqlpee kqpllmekedyhslyqshl

hslyqsh (SEC ID N°:8)
halyqs (SEC ID N°:9)
slyqs (SEC ID N°:10)
fkslyqs (SEC ID N°:7)
fhslyqsh (SEC ID N°:6)
yhslyesk (SEC ID N°:5)
yhslyqshl (SEC ID N°:2)
dfhslyqsh (SEC ID N°:4)
yhslyqshi (SEC ID N°:3)
dyhtlyqthl (SEC ID N°:1)

FIG. 1



Inhibidor: Estaurosporina
 Sustrato: KKKVSRSGLYRSPSPENLNRPR
 (SEC ID Nº :12)

FIG. 2

Chk2 humana (SEC ID N°: 17)

```

1  msresdveaq qshgssacsq phgsvtqsqq sssqsqgiss sststmpnss qsshsssgtl
61  ssletvstqe lysipedqep edqepeeptp apwarlwalq dgfanlecvn dnywfgrdks
121 ceycfdepll krtcdkyrtys kdhfrifrev gpknsyiayi edhsgngtfv ntelvgkgkr
181 rplnnnseia lslsrukfvv ffdltvddqs vypkalrdey imsktlgsga cgevklafer
241 ktckkvaiki iskrkfaigs areadpalnv eteieilkkk nhpciikikn ffdædyiv
301 lelmeggelf dkvvgmkrk eatklyfyg mllavqylhe ngiihrdlkp envllsgee
361 dclikitdfg hskilgets1 mrtlctpty lapevlsvg tagynravdc wslgvilfic
421 lsgyppfseh rtqvsikdqi tsgkynfiqe vwaevsekai dlvkkllyvd pkarfttea
481 lrhpwiqded mkrkfqd11s eenestalp qvlagpstrk rpregeaega ettkrpavca
541 avl

```

FIG. 3

Chk1 humana (SEC ID N°: 18)

```

1  mavpfvedwd lvqtlgegay gevqlavnrv teeavavkiv dmkravdcpe nikkeicink
61 mlnhenvvkf yghrregniq ylfleyccgg elfdrieppi gmpepdaqrf fhqlmagvvy
121 lhgigithrd ikpenllide rdnkisdff latvfrynnr erllnkmcgt lpyvapellk
181 rrefhaepvd vwscgivilta mlagelpwdg psdscqeyzd wkekktylnp wkkidsapla
241 llhkilvenp saritipdik kdrwynkplk kgakrprvts ggvsespqgf skhiqsnldf
301 spvnsassee nvkysssqqe prtglslwdt spsyidklvg gisfsqptcp dhmllnsqll
361 gtpgssqnpw qrlvkrntrf ftkldadkcy qclketcekl gyqwkkscmn qvtisttdrr
421 nnklifkvn1 lemddkilvd frlskgdgle fkrhflkikg klidivssqk vwlpat

```

FIG. 4

cdc25c humana (SEC ID N°: 19)

```

1  mstelfsstr eegssgsgps frsnqrkmIn lllerdsft vepdvprtpv gkflgdsanl
61  silsggtpkr cldlsnlsag eitatqItts addidetghld ssglqevhla gmnhdqhlmk
121 cspagllcst pngldrghrk rdamcsssan kendagnlvd semkylgspl ttvpkldknp
181 nlgedqaeei sdelmefslk dqeakvsrsq lyrspmpen lnrprlkqve kfkdnTipdk
241 vkkkyfsggg klrkgldlkk tvslcditit qmleedsnqg hligdfskvc alptvsgkhq
301 dlkyvnpetv aallsgkfqq liekfyvidc rypyeylggh iggalnlysq eelfnfflkk
361 pivpldtqkr iiivfhcefs sergprmcrc lreedrslnq ypalyypely ilkggyrdff
421 peymelcepg sycpmhhqda ktellrcrsq skvqegerql reqiallvkd msp

```

FIG. 5