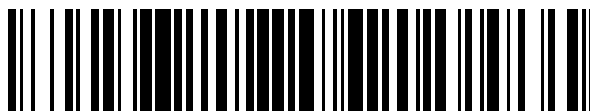


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 648 882**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2011 PCT/IL2011/000573**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO120111100**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2011 E 11749552 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.08.2017 EP 2596009**

54 Título: **Péptidos basados en el dominio de transmembrana de un receptor tipo toll (TLR) para el tratamiento de enfermedades mediadas por TLR**

30 Prioridad:

19.07.2010 US 365559 P

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

08.01.2018

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)**

**At the Weizmann Institute of Science, P.O. Box 95
76100 Rehovot, IL**

72 Inventor/es:

**SHAI, YECHIEL;
FINK, AVNER;
REUVEN, ELIRAN-MOSHE y
SHMUEL-GALIA, LIRAZ**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 648 882 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos basados en el dominio de transmembrana de un receptor tipo toll (TLR) para el tratamiento de enfermedades mediadas por TLR

Campo de la invención

- 5 La presente invención pertenece al campo de la inmunoterapia y se refiere particularmente a la inhibición de la activación de receptores tipo Toll (TLR) por péptidos originados a partir del dominio transmembrana de TLR.

Antecedentes de la invención

- 10 La respuesta inmune innata es un proceso complejo y altamente regulado. El objetivo de este sistema es proporcionar un amplio espectro y una rápida protección del huésped frente a los patógenos invasores, así como facilitar la activación y el posterior desarrollo de la respuesta inmune adquirida. En los últimos años, un gran cuerpo de evidencias ha indicado que la familia de receptores tipo Toll (TLR) juega un papel crítico en la activación de la respuesta innata y la respuesta inflamatoria (Foster et al., 2009; Mitchell et al., 2007; O'Neill et al., 2003).

- 15 Los TLR son una familia de receptores transmembrana conservados compuestos por un dominio extracelular, uno transmembrana único y un dominio de resistencia al receptor Toll-interleuquina citoplasmático (TIR). Estos receptores reconocen una amplia variedad de ligandos, llamados patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), tales como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias gram-negativas, ácido lipoteicoico (LTA) de bacterias gram-positivas y flagelina, así como muchos otros compuestos. Los TLR también ayudan al sistema inmune innato a identificar eventos necróticos, que resultan en la eliminación de varias "contaminaciones" del entorno (moléculas de patrones moleculares asociadas al daño, DAMP). Muchas células tumorales experimentan necrosis mediada por el sistema inmune y pueden conducir a una activación adicional de una respuesta de inflamación a través de los TLR.

- 20 Al unirse a su PAMP específico, estos receptores pueden formar homodímeros, tal como en el caso de TLR4, o heterodímeros como en el caso de TLR2 con TLR1 y TLR6. Por ejemplo, LTA causa una hetero-dimerización de TLR2 con los TLR 1 ó 6, y LPS (como un complejo con la proteína MD2), causa homodimerización de TLR4 (Ozinsky et al., 2000; Hajjar et al., 2001; Lee et al., 2003; Jin et al., 2007). Esto desencadena una cascada de señalización en sentido descendente, lo que da como resultado la activación del NFκB y otras vías de supervivencia tales como P38 y JNK. Uno de los productos principales de la activación de TLR es la secreción de TNFα, una citocina proinflamatoria importante que tiene muchos papeles en la progresión del proceso inflamatorio. La sobreexpresión o sobreactivación de TLR está asociada con una variedad de enfermedades, p. ej., el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), insuficiencia orgánica, exacerbación de infecciones virales latentes o activas (p. ej., infección por VIH, citomegalovirus, herpes simple y virus de la influenza), predisposición congénita o adquirida a infección bacteriana pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva y edema pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, mieloma múltiple, LES, lupus, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, enfermedades reumáticas, hepatitis crónica, malaria (*P. falciparum*), neuritis óptica, encefalitis viral (Nilo occidental), candidiasis, aterosclerosis, enfermedades degenerativas, enfermedades neurodegenerativas y varios tipos de cáncer. En casos extremos, la activación no regulada severa del proceso inflamatorio puede conducir a shock séptico, fallo orgánica y muerte (Foster et al., 2009; Meng et al., 2004).

- 25 Los intentos de regular la sobreexpresión o la activación de TLR incluyen principalmente el uso de antagonistas de TLR. El documento US 2010/062026 describe agentes con actividad antagonista de poli TLR (micobacteria) útiles en el tratamiento de enfermedades en las que los TLR están sobreexpresados. El documento WO 2009/019260 describe un método para reducir las actividades biológicas de TLR2 en la lesión por reperfundición de isquemia, usando antagonistas de TLR2. El documento WO 2009/047791 describe un nuevo antagonista de TLR sintético, potencialmente útil en el tratamiento de la inflamación, autoinmunidad, alergia, asma, rechazo de injerto, enfermedad de injerto contra huésped, infección, sepsis, cáncer e inmunodeficiencia. El documento US 7.410.975 describe un método para modular la señalización a través de TLR usando antagonistas de TLR de molécula pequeña. El documento US 2006/0211752 describe un método para tratar una enfermedad o trastorno mediado por TLR usando derivados de metimazol (antagonista de la hormona tiroidea) y/o derivados de tiona cíclicos.

- 30 La inflamación se ha relacionado con la formación y progresión del cáncer y se ha estudiado ampliamente durante la última década. En el cáncer de colon, se ha demostrado que la inflamación causada por *H. pylori* conduce a la formación de muchas mutaciones en las células del colon, incluida la expresión de oncogenes y la regulación a la baja de los genes supresores de tumores. Otros cánceres incluyen: carcinoma hepatocelular (HCC) a través de la inflamación inducida por el virus de la hepatitis B (VHB), cáncer gástrico y cáncer de pulmón.

- 35 De hecho, se ha demostrado que los TLR se expresan y activan en diversos tumores sólidos, pero sobre todo no en las células normales de estos órganos. Además, existen diferencias en el conjunto de TLR identificados en diferentes tipos de tumores (Sato et al., 2009). En general, estos hallazgos sugieren que el tumor tiene un mecanismo selectivo por el cual "decide" qué tipo de matriz de TLR se expresará. La expresión y la activación de los diversos TLR modulan el microambiente del tumor y lo protegen del aclaramiento del sistema inmune.

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios sobre el cáncer de próstata se han centrado en TLR4 y TLR9, que están

relacionados con los dos principales tipos de infecciones, bacterianas y víricas, identificadas en muestras de próstata. El TLR4 reconoce componentes de bacterias gramnegativas y el TLR9 reconoce el ADN monocatenario de virus (Huang et al., 2005). Es importante destacar que la regulación a la baja de la expresión de estas proteínas conduce a una disminución en el crecimiento del tumor de próstata, la formación de metástasis y la mortalidad en ratones (Kundu et al., 2008). Sin embargo, estos estudios usaron tecnología de ARNip que, aunque es altamente efectiva in vitro, es difícil de aplicar in vivo.

El documento WO 03/045431 describe métodos para tratar el cáncer usando una combinación de un antagonista del factor inhibidor de células dendríticas derivado de tumor, concretamente un anticuerpo de IL-10 o IL-10R, y un agonista de TLR9.

Tsung A. et al. [Tsung A. et al., Shock (2007) 27 (4): 364-369] describen un péptido inhibidor de la señalización del receptor tipo toll (TLR), denominado P13, que redujo la producción de mediadores inflamatorios inducida por LPS, produjo un daño menor al hígado y una mayor supervivencia en modelos murinos de la inflamación.

Estudios recientes demostraron un número significativo de incidencias de la infección por bacterias gram-positivas en secciones de próstata derivadas de pacientes con prostatectomía en diversas etapas de la enfermedad (Saenz-Abad et al., 2008; Sfanos et al., 2008). Por lo tanto, los inventores plantean la hipótesis de que los TLR 1, 2 y 6 que son activados por el ácido lipoteicoico también juegan un papel en el cáncer de próstata.

Como se indicó anteriormente, la activación de TLR no regulada puede conducir a enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer (EA), una enfermedad neurodegenerativa progresiva caracterizada por pérdida neuronal, activación de microglia, reactivación de astrocitos y acumulación de agregados intracelulares y extracelulares. De acuerdo con la "hipótesis amiloide", los extensos depósitos extracelulares de β amiloide fibrilar ($\text{fA}\beta$) se condensaron para formar placas seniles en el cerebro que son la principal causa de neurodegeneración en la EA. Postula que el desequilibrio en la producción y el aclaramiento de $\text{A}\beta$ lleva a un aumento en sus niveles de estado estacionario dentro del cerebro a lo largo de décadas, dando como resultado los complejos cambios moleculares y celulares dentro del cerebro que caracterizan a la enfermedad de Alzheimer. $\text{A}\beta$ se produce mediante la escisión de APP (péptido precursor de amiloide) por α o β secretasa y posteriormente la y secretasa dando como resultado dos formas principales que tienen 40 y 42 restos de longitud. En un individuo normal, la mayoría de la $\text{A}\beta$ producida es la especie de 40 aminoácidos, mientras que el 5-15% de las formas $\text{A}\beta$ total son $\text{A}\beta_{42}$. Sin embargo, $\text{A}\beta_{42}$ es más tóxico y forma fibrillas más estables y, por lo tanto, está más relacionado con la enfermedad de Alzheimer.

Una amplia investigación ha demostrado la participación de la inflamación en la enfermedad de Alzheimer. Las principales células efectoras inmunes del cerebro son las células de la microglia que se sabe que son reclutadas en sitios de placas $\text{fA}\beta$ en la enfermedad de Alzheimer. Estas células mostraron un fenotipo activado y altos niveles de proliferación cuando se rodearon con $\text{fA}\beta$, lo que sugiere el papel de esas células en el fenotipo inflamatorio que caracteriza a la enfermedad de Alzheimer. La eliminación de las células de microglia del cultivo que contiene células cerebrales mixtas y $\text{fA}\beta$ elimina casi por completo los efectos tóxicos de $\text{fA}\beta$ en las neuronas primarias, lo que implica que la microglia o sus productos median los efectos neurotóxicos de $\text{fA}\beta$. Aunque las células de microglia y macrófagos muestran un papel en la progresión de la enfermedad de Alzheimer, algunos aspectos de la respuesta inflamatoria microglial representan influencias positivas con respecto a la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer, tal como el aclaramiento fagocítico de $\text{A}\beta$ del cerebro. Sin embargo, el daño prolongado de la respuesta inflamatoria mediada por microglia probablemente exacerba la patogénesis de la enfermedad. Además, los niveles de citoquinas proinflamatorias dependen de la magnitud de la existencia de placas en el cerebro de la enfermedad de Alzheimer.

Algunos TLR emplean correceptores adicionales que ayudan en el reconocimiento de patógenos, tales como CD14 para TLR4. Recientemente se demostró que TLR4 media la muerte celular neuronal extensa tras el tratamiento con LPS en cultivos de células microgliales y, lo que es más importante, in vivo (Lehnardt et al., 2003). Este hallazgo sugiere que TLR4, un receptor asociado hasta ahora con la defensa contra microorganismos, puede ser relevante en la neuroinflamación crónica en la enfermedad de Alzheimer. Recientemente, los TLR se han visto implicados en la activación microglial en la enfermedad de Alzheimer y cómo los TLR funcionan en la respuesta inflamatoria en la EA se encuentra ahora bajo investigación activa. Utilizando una variedad de técnicas, se demostró que CD14 se unía a $\text{fA}\beta_{42}$. Se demostró además que la interacción entre $\text{fA}\beta_{42}$ y CD14 es 20 veces mayor que la existente entre CD14 y no $\text{fA}\beta$, lo que indica la importancia de la estructura fibrilar de $\text{A}\beta$ en la unión de CD14. Los TLR han demostrado tener un papel en la apoptosis neuronal también. Las neuronas hipocámpales expuestas a los medios condicionados de la microglia tratada con $\text{fA}\beta$ dieron como resultado la muerte neuronal. Sin embargo, los medios de las células de microglia CD14^{-/-} o TLR4^{-/-} tratadas con $\text{fA}\beta$ no pudieron matar las neuronas (Fassbender et al., 2004 y Walter et al., 2007). Estos datos sugieren que CD14 y TLR4 funcionan en la producción de moléculas neurotóxicas. Además, recientemente se descubrió que las neuronas expresan varios TLR y que la expresión de TLR4 aumenta en las neuronas cuando se expone a $\text{fA}\beta$, lo que conduce a la apoptosis neuronal. Este hallazgo sugiere que las neuronas que expresan TLR4 son vulnerables a la degeneración en AD (Sung-Chun et al., 2008).

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 75-90, 92-94, 96-120 y 121, en donde el sintético péptido inhibe la activación celular mediada por un receptor tipo Toll (TLR), para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR seleccionada del grupo que consiste en una inflamación, una enfermedad inflamatoria del intestino, infección, enfermedad autoinmune, enfermedad pulmonar, insuficiencia cardíaca, enfermedad degenerativa, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad reumatoidea, lesión por perfusión isquémica, enfermedad fibrótica, caquexia, rechazo del injerto, daño por irradiación, asma y cáncer.

La presente invención se refiere también a un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17-73 y 74, estando unida la secuencia de aminoácidos en sus extremos N y/o C a uno o más restos de aminoácidos cargados positivamente, en donde dicho péptido sintético inhibe la activación celular mediada por un receptor tipo Toll (TLR)), para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR seleccionada del grupo que consiste en una inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, infección, enfermedad autoinmune, enfermedad pulmonar, insuficiencia cardíaca, enfermedad degenerativa, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad reumatoidea, lesión por perfusión isquémica, enfermedad fibrótica, caquexia, rechazo de injerto, daño por radiación, asma y cáncer.

Preferiblemente, dicho aminoácido cargado positivamente es lisina, arginina, histidina u ornitina.

Preferiblemente, dicha enfermedad mediada por TLR se selecciona del grupo que consiste en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), choque séptico, sepsis, choque endotóxico, choque hemodinámico, neuritis óptica, síndrome de sepsis, lesión por perfusión postisquémica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, infección por VIH, citomegalovirus, herpes simple, virus de la gripe, malaria, hepatitis crónica, candidiasis, infección por micobacterias, meningitis, insuficiencia cardíaca congestiva, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, predisposición a la infección pulmonar por bacteria; insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, carcinoma gástrico, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario epitelial, carcinomas de células escamosas cervicales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y neuroblastoma.

Preferiblemente, dicha enfermedad mediada por TLR es una inflamación aguda tal como el choque séptico o el cáncer, tal como el cáncer de próstata.

La presente invención se refiere también a un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NOs: 75-90, 92-94, 96-120 y 121, en donde el péptido sintético inhibe la activación celular mediada por dicho receptor tipo Toll (TLR).

La presente invención se refiere también a un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17-73 y 74, estando la secuencia de aminoácidos unida en sus extremos N- y/o C- a uno o más restos de aminoácidos cargados positivamente, en donde dicho péptido sintético inhibe la activación celular mediada por dicho TLR.

Preferiblemente, dicho aminoácido cargado positivamente es lisina, arginina, histidina u ornitina.

Preferiblemente, se añaden uno o dos restos de lisina a uno o ambos extremos N- o C-.

La presente invención se refiere también a una composición farmacéutica que comprende un péptido sintético y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Breve descripción de los dibujos

Las Figs. 1A-1D muestran que el efecto de los péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR1 y TLR2 sobre la secreción de TNF α por las células RAW264.7, depende del patrón molecular asociado a patógenos (PAMP). (1A-1B) Las células se incubaron durante 2 horas con diferentes concentraciones de los péptidos transmembrana (TM) indicados mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) luego se lavaron y estimularon con bajas concentraciones de ácido lipoteicoico (LTA) (100 ng/ml, 1A) o lipopolisacárido (LPS, 10 ng/ml, 1B). (1C-1D) Las células se incubaron con 20 μ M de los péptidos indicados y luego se estimularon con alta concentración de LTA (500 ng/ml, 1C) o LPS (10 ng/ml, 1D). Los niveles de TNF α en el sobrenadante después de 5 horas de estimulación se evaluaron mediante ELISA.

Las Figs. 2A-2C muestran transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) y otros péptidos de TM. El péptido mTLR1 TM C' se marcó con fluoresceína (Donante) y se cargó en PC:vesículas unilaminares grandes de colesterol (LUV). Los cambios en la intensidad de la señal de

emisión se controlaron entre 500 y 600 nm, tras la adición de cantidades sucesivas de mTLR1 TM C'-CtoA marcada con rodamina (SEQ ID NO: 83; homodímeros, 2B) y mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86; heterodímeros, 2C). El péptido de dominio TCR α TM marcado con rodamina (Cp; GLRILLKLV-NH₂, SEQ ID NO: 123) se usó como control negativo (2A).

5 Las Figs. 3A-3C muestran FRET entre mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y otros péptidos TM. El péptido mTLR1 TM N' marcado con fluoresceína (donante) y cargado en PC: colesterol LUV. Los cambios en la intensidad de la señal de emisión se controlaron entre 500 y 600 nm, tras la adición de cantidades sucesivas de mTLR1 TM N' marcada con rodamina (SEQ ID NO: 77; homodímeros, 3B) y mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88; heterodímeros, 3C). El péptido de dominio TCR α TM marcado con rodamina (Cp; GLRILLKLV-NH₂, SEQ ID NO: 123) se usó como control negativo (3A).

Las Figs. 4A-4B muestran que los péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR1 tienen altas afinidades hacia membranas miméticas. La emisión de 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD) - marcada mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77; 4A) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83; 4B) se siguió a la titulación con LUVs. Un aumento en la señal a 530 nm indica la asociación del péptido NBD con PC:vesículas hidrofóbicas de colesterol.

15 Las Figs. 5A-5B muestran que los péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR2 son capaces de interactuar físicamente con la proteína TLR1 en lugar de con otros TLR. (5A) Se incubaron células de macrófago RAW264.7 con los péptidos marcados con rodamina mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88) y mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) a las concentraciones indicadas. Las células con el péptido se lavaron y se lisaron, la fracción soluble se usó para la coimmunoprecipitación (co-IP) con diferentes anticuerpos TLR. Las muestras de proteína se analizaron en SDS-PAGE y la presencia del péptido marcado se detectó con un escáner fluorescente (Excitación-532 nm, emisión: 585 nm). (5B) Las muestras de proteínas se analizaron mediante transferencia western para la detección de proteínas y complejos de TLR específicos, con anticuerpos específicos, como se indica (α TLR1, 2 y 4).

25 Las Figs. 6A-6B muestran espectroscopia de dicroísmo circular (CD) que revela diferencias estructurales entre los diferentes péptidos en micelas de lisofosfatidilcolina (LPC). (6A) CD realizado para péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR1, concretamente, mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) muestran una hélice α característica para ambos péptidos C-terminales y N-terminales. La señal para mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) es muy débil, lo que sugiere un contenido de hélice α relativamente bajo. Téngase en cuenta que esta señal se obtuvo solo a una alta concentración de péptido 50 μ M. (6B) péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR2, a saber, mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88) y mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) muestran una hélice α característica para ambos péptidos del extremo C-terminal y N-terminal.

30 Las Figs. 7A-7D muestran que los péptidos basados en el dominio transmembrana de TLR1 y TLR2 difieren en su capacidad para autoensamblarse tanto en tampón como en PC:LUVs de colesterol. (7A-7B) Péptidos TLR conjugados con rodamina mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) se añadieron a una solución de HEPES y se registró su emisión a 585 nm antes y después de la adición de proteinasa K. La adición de la proteinasa K está indicada por una flecha negra. mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) son capaces de autoensamblarse en solución, a una muy ligera extensión (7A). mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88) altamente oligomerizado en solución (línea negra, 7B) y está parcialmente disociado en presencia de LUV (línea gris, 7B). (7C-7D) En presencia de LUV, tanto mTLR1 TM N' como mTLR1 TM C' son capaces de autoensamblarse, mientras que mTLR2 TM N' y mTLR2 TM C' no cambian antes y después de la adición de LUV al sistema (7C). LL37 se muestra como un ejemplo para un péptido que está altamente oligomerizado en liposomas (7D).

45 La Fig. 8 muestra que mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) es capaz de inhibir la activación de TLR2 in vivo. Los ratones fueron tratados con una sola inyección i.p. de LTA, luego se inyectó con mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) en las concentraciones indicadas o no se trata (solución salina solamente, cuadrados negros). Se administró una segunda inyección durante 2 horas (1 mg/kg, rectángulos negros) o 12 horas después (5 mg/kg, diamantes negros). La supervivencia fue monitoreada durante los siguientes 14 días. La supervivencia de los ratones no tratados cayó a 0 después de 48 horas, mientras que 5 mg/kg de mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) pudieron rescatar hasta el 62,5% de los ratones sin efectos adversos perceptibles. n = 8 para todos los grupos.

50 La Fig. 9 muestra la expresión de ARNm de los diversos transcritos de TLR (TLR 1, 2 y 6) en dos líneas celulares de cáncer de próstata diferentes PC3 y LNCaP. Está claro que existe una diferencia en la expresión de las transcripciones entre las líneas celulares. PC3 es la única línea celular que expresa todas las transcripciones de TLR probadas.

55 La Fig. 10 muestra la activación de NF κ B en células PC3 y su inhibición específica con el péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83). Las células se transfectaron con un plásmido de luciferasa bajo el control transcripcional de NF κ B. Tras la activación, NF κ B se transloca al núcleo e induce la expresión de luciferasa. Las células se activaron en presencia de LTA (50 μ g/ml) o LPS (μ g/ml) durante 24 horas y se incubaron durante 2 horas con el péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) (20 μ M) antes de la adición del activador y se lavó dos veces con PBS. La detección de la expresión de Luc se realizó mediante el kit de ensayo Steady-Glo.

La Fig. 11 muestra una evaluación de la influencia del péptido en la velocidad de crecimiento de las células PC3. Las células se cultivaron durante 72 horas en presencia del péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) mientras que cada 24 horas se cambió el medio y se añadió un nuevo péptido. Para las células de control, se añadió PBS.

5 La Fig. 12 muestra la expresión de ARNm de TGF β y VEGF en células LNCaP y PC3 en ausencia o presencia de LPS/LTA.

La Fig. 13 muestra la expresión de ARNm de TGF β y VEGF en células LNCaP y PC3 en ausencia o presencia de LPS/LTA y el péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) a una concentración de 20 μ M.

10 La Fig. 14 representa FRET entre TLR6 C9 TMD (SEQ ID NO: 85) y TLR4 C11 TMD (SEQ ID NO: 95). El péptido TLR4 se marcó con NBD (donante) y se cargó en PC: LUV de colesterol. Los cambios en la intensidad de la señal de emisión se controlaron entre 500 y 600 nm, tras la adición de cantidades sucesivas de TLR6 C TM marcado con rodamina. Las concentraciones de péptidos utilizadas son (de arriba hacia abajo) 0 μ M, 0,0125 μ M, 0,025 μ M, 0,05 μ M, 0,1 μ M, 0,2 μ M, 0,4 μ M y 0,8 μ M. Las concentraciones de péptidos donantes usadas son 0,4 μ M.

15 La Fig. 15 muestra la hetero-dimerización de los péptidos TMD TLR4 y TLR6 en la membrana de las células vivas según se mide usando el ensayo GALLEX. Las actividades se muestran con respecto a la cepa que expresa la quimera G831 de ambos plásmidos TLR6 N6 (SEQ ID NO: 96); TLR6 C10 (SEQ ID NO: 94); TLR4 C3 (SEQ ID NO: 122).

20 La Fig. 16 representa el efecto de los péptidos TMD TLR4 y TLR6 sobre la secreción de TNF α por las células macrófagos RAW264.7. Las células se incubaron durante 2 horas con 20 μ M de los péptidos indicados y luego se lavaron y estimularon con β amiloide fibrilar (fA β) durante 24 h (concentración final 10 μ M). Los niveles de TNF α en el sobrenadante se evaluaron mediante ELISA. TLR TLR4 C1 (SEQ ID NO: 95); TLR 4 C2 (SEQ ID NO: 90); TLR6 C9 (SEQ ID NO: 83); TLR6 N6 (SEQ ID NO: 96).

Descripción detallada de la invención

25 Desde su descubrimiento en seres humanos a finales de la década de los 90, los receptores tipo Toll (TLR) se mostraron en numerosos estudios como esenciales para el inicio y la progresión de la respuesta inmune innata. También se demostró que estos receptores eran de gran importancia en muchos otros procesos fisiológicos, tales como el metabolismo lipídico, la progresión del cáncer y la neurogénesis (Huang et al., 2007; Rolls et al., 2007; Shi et al., 2006). Como consecuencia de su papel esencial en tantos procesos diferentes, su modo de acción y regulación fue ampliamente estudiado, concentrándose tanto en las colas citoplásmicas como en los tallos extracelulares.

30 A pesar del extenso trabajo realizado tanto en los dominios extracelulares como citoplásmicos de los diferentes TLR, hasta la fecha, casi no se ha trabajado en las regiones transmembrana de estas proteínas. Sin embargo, durante las últimas dos décadas, ha habido una amplia evidencia que indica que los dominios transmembrana de las proteínas de membrana desempeñan un papel importante en su activación y regulación. Estudios recientes han demostrado que los dominios TM de varios TLR y sus regiones hidrofóbicas flanqueantes podrían estar implicados en su tráfico y activación (Kajita et al., 2006; Nishiya et al., 2006).

35 De acuerdo con la presente descripción, se proporcionan evidencias que muestran que los dominios transmembrana (TM) de TLR1/6 y TLR2 están implicados en la activación y regulación de estos receptores. Los péptidos exógenos correspondientes al extremo N terminal o el extremo C extendido de estas regiones pudieron inhibir la secreción de TNF α por los macrófagos RAW264.7 en respuesta a la estimulación con LTA (Figs. 1A y 1C). Esta inhibición fue específica de TLR2, ya que estos péptidos no afectaron la secreción de TNF α en respuesta a LPS, un activador de TLR4 (Figs. 1B y 1D). Se demostró que estos péptidos eran relativamente no tóxicos para los macrófagos RAW264.7 en las condiciones experimentales de los investigadores, que presentan LC50 de más de 50 μ M para todos los péptidos (Tabla 1).

45 Las interacciones entre los péptidos también se observaron en PC: vesículas unilaminares grandes de colesterol (LUV), que constituyen un entorno lipídico comúnmente utilizado para imitar la membrana eucariota. Se demostró que los péptidos TLR1 TM pueden formar heterodímeros así como homodímeros con TLR2 TM, con mayor propensión hacia heterodímeros (Figs. 2A-2C y 3A-3C). En ambos casos, la intensidad de la transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) fue mayor que la observada para Cp, un péptido TM no relacionado (el péptido TM central de TCR α).

50 Para respaldar estos hallazgos, se usó co-inmunoprecipitación (co-IP) para mostrar que los péptidos basados en el dominio TM de TLR2 pueden interactuar físicamente con la proteína TLR1, y que TLR1, 2 y 4 son capaces de interactuar entre sí (Figs. 5A y 5B, respectivamente).

55 El examen de la capacidad de estos péptidos para formar oligómeros apoyó las observaciones FRET de los inventores e indicó que los péptidos TLR1 TM eran capaces de formar homodímeros en LUV, hasta cierto punto. Es de destacar que estos experimentos muestran que aunque el péptido TLR2 TM está altamente agregado en solución debido a su alta hidrofobicidad, es capaz de disociarse en un estado monomérico con la adición de LUV al sistema

(Figs. 7A-7B).

Además, el péptido mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) también se demostró que inhibía la activación de TLR2 in vivo. Utilizando un modelo murino para el choque séptico agudo causado por LTA, se demostró que la administración de este péptido era capaz de rescatar a más del 60% de los ratones en comparación con la supervivencia de ratones no tratados (Fig. 8). Debido al hecho de que la muerte estaba causada por la activación excesiva y desequilibrada de TLR2, el péptido mTLR2 TM C'-CtoA está muy probablemente implicado directamente en la inhibición de la activación de TLR2 en estos animales. El descubrimiento de que las tasas de mortalidad se mantenían estables desde las 48 horas después de la inyección de LTA y de ahí en adelante, sugiere que los animales supervivientes se curaron de forma completa e irreversible sin efectos adversos notables.

De acuerdo con la presente descripción, se proporcionan además pruebas que demuestran que los péptidos que comprenden la secuencia de los dominios transmembrana (TM) de TLR4/6 son capaces de formar heterodímeros y péptidos exógenos correspondientes al extremo N o al extremo C de la región TLR6 TM o los péptidos correspondientes al extremo C de la región TLR4 TM pudieron inhibir la secreción de TNF α por los macrófagos RAW264.7 en respuesta a la estimulación β -amiloide fibrilar (Fig. 16).

Al examinar los niveles de ARNm de expresión de diversos TLR en varios tipos de líneas celulares de cáncer de próstata, se encontró que tanto PC3 como DU145 (altamente metastásico) expresan casi todos los TLR probados, mientras que en LNCaP y 22RV1 (bajo metastásico), solo se detectaron los transcritos de ARNm TLR1, 2 y 6 (Fig. 9, datos mostrados solo para células PC3 y LNCaP).

Un ensayo de expresión de luciferasa (Luc) en células PC3 mostró que la activación con LPS (un activador de TLR4) o LTA (activador de TLR2) dio como resultado un aumento significativo en la expresión de Luc. La adición del péptido TLR2 TM C' humano (SEQ ID NO: 83) provocó una disminución en la expresión de Luc para la activación de LTA pero no para la activación de LPS (Fig. 10). Además, la incubación de las células con el péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83), causó la inhibición en la proliferación de células PC3 (Fig. 11).

Se examinó el nivel de ARNm de expresión de las citoquinas TGF β y VEGF en células PC3 (altamente metastásicas) y células LNCaP (poco metastásicas) tras la activación con LPS y LTA. Curiosamente, solo las células PC3 mostraron un marcado aumento en la expresión de ARNm de las citocinas tras la estimulación (Fig. 12). Además, se observó una caída en los niveles de expresión en presencia del péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) (Fig. 13).

Tomados en conjunto, los resultados de los inventores demuestran la capacidad de los péptidos basados en los dominios TM de TLR2, 1 y 6 para inhibir la activación de TLR2 tanto in vitro como in vivo, para formar heterodímeros e interactuar con los receptores nativos. Por lo tanto, constituyen candidatos fuertes para la terapia en una variedad de patologías donde se necesita la inhibición de TLR2. Los resultados de los inventores demuestran aún más la capacidad de los péptidos basados en los dominios TM de TLR4 y 6 para inhibir la activación de TLR4/6, formar heterodímeros e interactuar con los receptores naturales. Estos péptidos constituyen candidatos fuertes para la terapia de neurodegeneración causada por β - amiloide fibrilar en la enfermedad de Alzheimer.

Además, los resultados de los inventores muestran una correlación entre el nivel de expresión de matrices TLR específicos en líneas celulares de cáncer de próstata, su capacidad para secretar citocinas antiinflamatorias y su capacidad para generar metástasis. Por lo tanto, el nivel de expresión de matrices específicas de TLR en ciertas células tumorales puede usarse en el diagnóstico como marcadores de la agresividad del cáncer (es decir, la capacidad de generar metástasis).

En algunas realizaciones, el TLR es un TLR de mamífero 1, 2, 4 ó 6. En otras realizaciones, el TLR de mamífero es TLR1, TLR2, TLR4 o TLR6 humano (hTLR) o de ratón (Musculus, mTLR).

En ciertas realizaciones, el péptido sintético de la descripción comprende una secuencia que consiste en, o se encuentra dentro de la secuencia del dominio transmembrana (TM) de un TLR seleccionado de TLR 1, 2, 4 y 6, opcionalmente flanqueado por una región intracelular o extracelular, o ambas, del TLR correspondiente, donde:

(i) dicho TLR1 humano tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 2;

(ii) dicho TLR2 humano tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 4;

(iv) dicho TLR6 humano tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 5 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana previsto y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 6;

(v) dicho TLR1 de ratón tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 7 o una

secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 8;

(vi) dicho TLR2 de ratón tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 9 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 10;

(viii) dicho TLR6 de ratón tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 11 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 12;

(ix) dicho TLR 4 de ratón tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 13 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 14; y

(x) dicho TLR 4 humano tiene un dominio transmembrana predicho de la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 15 o una secuencia que comprende dicho dominio transmembrana predicho y sus regiones flanqueantes citoplásmicas y extracelulares expuestas en SEQ ID NO: 16.

Los dominios de TM predichos se obtuvieron de la base de datos UniProt/swissprot, pero otros dominios de TM predichos (idénticos o similares) podrían haberse calculado utilizando cualquier otro algoritmo conocido fácilmente disponible para cualquier persona experta en la técnica, tal como la red neuronal de Pasquier y Hamodrakas, 1999 (An hierarchical artificial neural network system for the classification of transmembrane proteins. Protein Eng 1999 Aug; 12 (8): 631 - 4). Por lo tanto, las secuencias de dominio de TM predichas descritas son ejemplos posibles, y no deben interpretarse como limitantes de los péptidos de la presente descripción a las secuencias descritas. Por ejemplo, el dominio TM predicho usando un algoritmo diferente podría ser desplazado por unos pocos aminoácidos a lo largo de la secuencia de aminoácidos del polipéptido TLR y podría ser de una longitud diferente.

En ciertas realizaciones, el péptido sintético consiste en de 16 a 23 restos de aminoácidos encontrados dentro del dominio transmembrana predicho de 21-30 restos de aminoácidos de dicho TLR humano o de ratón. En otras realizaciones, el péptido sintético se selecciona de los péptidos de las secuencias indicadas en la SEQ ID NO: 17 a SEQ ID NO: 23.

En algunas realizaciones, el péptido sintético consiste en de 14 a 19 restos de aminoácidos, 4 a 17 de los cuales se encuentran dentro del dominio transmembrana predicho de dicho TLR humano o de ratón y de 1 a 14, preferiblemente de 3 a 9, se encuentran dentro de la región citoplásmica adyacente a dicho dominio transmembrana. En otras realizaciones, el péptido sintético se selecciona de los péptidos de las secuencias expuestas en la SEQ ID NO: 24 a SEQ ID NO: 43.

Como se usa en este documento, el término "análogo" se refiere a la delección, adición o sustitución de uno o más restos de aminoácidos. Cuando se preparan análogos obtenidos por sustitución de restos de aminoácidos, es importante que las sustituciones se seleccionen de aquellas que cumulativamente no cambien sustancialmente el volumen, el patrón hidrófobo-hidrófilo y la carga de la porción correspondiente del péptido parental no sustituido. Por lo tanto, un resto hidrófobo puede estar sustituido con un resto hidrófilo, o viceversa, siempre que el efecto total no modifique sustancialmente el volumen, el patrón hidrofóbico-hidrófilo y la carga del correspondiente péptido parental no sustituido, es decir, mientras el motivo de unión a TLR se mantenga.

Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el análogo peptídico sintético se obtiene a partir del péptido sintético por delección, adición o sustitución de uno o más restos de aminoácidos, preferiblemente por sustitución de uno a cuatro restos de aminoácidos por alanina. En otras realizaciones, el análogo peptídico sintético consiste en de 14 a 35, preferiblemente 16, restos de aminoácidos, de 6 a 21, preferiblemente 8, de los cuales se encuentran dentro del dominio transmembrana predicho de un TLR humano o de ratón, y de 1 a 14, preferiblemente 8, se encuentran dentro de la región citoplásmica o extracelular de dicho dominio transmembrana, y de uno a cuatro restos de aminoácidos de la región citoplásmica están sustituidos con alanina, arginina, lisina, histidina o serina; o el análogo peptídico consiste en restos de aminoácidos, preferiblemente 18, dentro de dicho dominio transmembrana predicho, en el cual uno o dos restos de aminoácidos están sustituidos con alanina. Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones, el péptido sintético tiene una secuencia seleccionada de las secuencias de SEQ ID NO: 44 a SEQ ID NO: 74. En todos estos péptidos sintéticos, los restos de cisteína se mutaron en alaninas para facilitar la síntesis. Este enfoque se usa comúnmente y se basa en el hecho de que los restos de cisteína dentro de los dominios TM usualmente no afectan la actividad de una proteína de membrana (Frillingos et al., 1998; He et al, 1996).

También se incluyen en el alcance de la presente descripción análogos de D, L-aminoácido. Estos análogos pueden poseer propiedades farmacológicas avanzadas tales como mejor solubilidad en agua y degradación controlada por enzimas proteolíticas.

Se debe entender que otras modificaciones de los péptidos y análogos de los mismos también se contemplan en la presente descripción. Por tanto, el péptido o análogo de la presente descripción pretende incluir un "derivado químico" del mismo que retiene al menos una porción de la función del péptido que permite su utilidad en la

modulación de la actividad de una proteína TLR en respuesta a la activación del ligando.

Un "derivado químico" de un péptido o análogo de la presente descripción contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte del péptido. Las modificaciones covalentes del péptido están incluidas dentro del alcance de esta invención. Tales modificaciones se pueden introducir en la molécula haciendo reaccionar restos de aminoácidos diana del péptido con un agente de derivación orgánico que sea capaz de reaccionar con cadenas laterales o restos terminales seleccionados. Muchos de tales derivados químicos y métodos para prepararlos son bien conocidos en la técnica.

En ciertas realizaciones, el derivado químico es un éster, amida o derivado de N-acilo del péptido sintético. El derivado N-acilo es opcionalmente un grupo acilo de un ácido carboxílico C₆-C₁₈, preferiblemente un grupo acilo de un ácido graso C₆-C₁₈ saturado o insaturado. Ejemplos de ácidos grasos incluyen, pero no están limitados a, ácido hexanoico, ácido heptanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido undecanoico, ácido dodecanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido transhexadecanoico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido linolénico y ácido elaidico. En ciertas realizaciones, el péptido se une covalentemente a un polímero no proteico, tal como polietilenglicol (PEG) para aumentar la estabilidad del péptido y cambiar la velocidad a la que se elimina de un sujeto después de la administración al mismo. El PEG es un polímero sustituido o no sustituido que tiene un peso molecular de aproximadamente 1000 a aproximadamente 5000 Da o más. Otros ejemplos no limitantes de dichos polímeros son poli(propilenglicol) o poli(oxialquileno).

También se incluyen en el alcance de la descripción las sales de los péptidos y análogos de la descripción. Como se usa en este documento, el término "sales" se refiere tanto a sales de grupos carboxilo como a sales de adición de ácidos de grupos amino de la molécula peptídica. Las sales de un grupo carboxilo se pueden formar por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o cinc, y similares, y sales con bases orgánicas tales como las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaína y similares. Las sales de adición de ácido incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos, tales como, por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Tales derivados químicos y sales se usan preferiblemente para modificar las propiedades farmacéuticas del péptido en lo que se refiere a la estabilidad, solubilidad, etc.

En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos cargados positivamente añadidos en cada uno de los extremos N y C, se seleccionan de lisina, arginina, histidina u ornitina. En otras realizaciones, se añaden uno o dos, preferiblemente dos, restos de lisina en uno o ambos extremos del péptido, preferiblemente en ambos extremos. La adición de restos de lisina en los extremos del péptido sirve para mejorar su solubilidad en fluidos fisiológicos. Por lo tanto, en las realizaciones preferidas, el péptido sintético tiene una secuencia seleccionada de: SEQ ID NO: 75 a SEQ ID NO: 122.

Los péptidos cíclicos se pueden sintetizar mediante un método de fase sólida, con o sin restos de cisteína en los extremos N y C de los péptidos. La ciclación sin cisteína se lleva a cabo protegiendo el N-terminal, activando el C-terminal, luego desprotegiendo el N-terminal y haciendo reaccionar los grupos C- y N-terminal mientras todavía están unidos a la resina. Cuando el péptido contiene restos de cisteína en los extremos N y C, después de la escisión con HF y la purificación con RP-HPLC, los péptidos se solubilizan a baja concentración en PBS (pH 7,3) y la ciclación se completa después de 12 h. Los péptidos cíclicos se purifican adicionalmente en RP-HPLC y se someten a análisis de aminoácidos para confirmar su composición, y SDS-PAGE para confirmar su estado monomérico.

En ciertas realizaciones, el péptido sintético de la presente descripción es capaz de inhibir la actividad de una proteína TLR en respuesta a la activación del ligando.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere a una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos sintéticos de la invención.

En otro aspecto más, la presente descripción se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido sintético de acuerdo con la descripción y un vehículo farmacéuticamente aceptable. De acuerdo con ciertas realizaciones, la composición farmacéutica es para el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR.

En otro aspecto, la presente descripción se refiere al uso del péptido sintético de la descripción, para el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR.

En otro aspecto más, la presente descripción se refiere a un método para el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR, que comprende administrar a un paciente que padece dicha enfermedad mediada por TLR una cantidad eficaz del péptido sintético de la invención, opcionalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En algunas realizaciones, la enfermedad mediada por TLR es una inflamación aguda tal como un choque séptico o cáncer, tal como un cáncer de próstata. En otras realizaciones, la enfermedad mediada por TLR se selecciona de: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS); inflamación aguda (por ejemplo, choque séptico, sepsis, choque endotóxico, choque hemodinámico, neuritis óptica y síndrome de sepsis); lesión por reperfusión isquémica posterior, enfermedades inflamatorias del intestino (p. ej., la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa); agudización de infecciones latentes o activas (por ejemplo, infección con VIH, citomegalovirus, herpes simple, virus de la gripe,

- 5 malaria, hepatitis crónica, candidiasis, infección por micobacterias y meningitis); insuficiencia cardíaca congestiva; enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico); enfermedad pulmonar obstructiva crónica; predisposición a infección bacteriana pulmonar; insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar; enfermedades reumatoideas (por ejemplo, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y otras afecciones artríticas); enfermedades degenerativas (por ejemplo, aterosclerosis), enfermedades neurodegenerativas (p. ej, la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson); enfermedad fibrótica; caquexia; rechazo del injerto; daño por radiación; asma y cáncer tales como carcinoma gástrico, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario epitelial, carcinomas de células escamosas cervicales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y neuroblastoma.
- 10 Cualquier ruta de administración adecuada está abarcada por la invención, que incluye las vías oral, intravenosa, subcutánea, intraarticular, intramuscular, por inhalación, intranasal, intratecal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica u otras rutas conocidas, que incluyen la ruta enteral. En realizaciones preferidas, los péptidos o análogos de la invención se administran por vía oral, intranasal o subcutánea.
- 15 Los intervalos de dosis para la administración de las composiciones de la presente invención deben ser lo suficientemente grandes para producir el efecto deseado, por lo que, por ejemplo, se regula la sobreexpresión o la sobre-activación de un TLR, y además, cuando la enfermedad se trata significativamente. Las dosis no deberían ser tan grandes como para causar efectos secundarios adversos, tales como reacciones cruzadas no deseadas, inmunosupresión generalizada, reacciones anafilácticas y similares.
- 20 La presente descripción se describirá ahora con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes y las figuras adjuntas.

Ejemplos

En los ejemplos a continuación, los péptidos de la descripción se presentarán por sus SEQ ID NOs. Los dominios de TM predichos se obtuvieron de la base de datos UniProt/swissport.

Lista de péptidos:

- 25 SEQ ID NO: 1 - LLIVTIVATMLVLAVTVTSLC (TLR1 humano TM predicho);
- SEQ ID NO: 2 - DFHMSELSCNITLLrVTIVATMLVLAVTVTSLCIYLDLPW (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR1 humano);
- SEQ ID NO: 3 - ALVSGMCCALFLLILLTGVLCH (TLR2 humano TM-predicho);
- 30 SEQ ID NO: 4 - DVRLSVSECHRTALVSGMCCALFLLILLTGVLCHRFHGLW (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR2 humano);
- SEQ ID NO: 5 - LLIVTIGATMLVLAVTVTSLC (TLR6 humano TM-predicho);
- SEQ ID NO: 6 - DFHMSELSCNITLLrVTIGATMLVLAVTVTSLCIYLDLPW (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR6 humano);
- SEQ ID NO: 7 - VLLTVTIGATMLVLAVTGAF (TLR1 de ratón TM-predicho);
- 35 SEQ ID NO: 8 - DFHMSPLSCDTVLLTVTIGATMLVLAVTGAFCLYFDLPWYVR (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR1 de ratón);
- SEQ ID NO: 9 - AALVSGVCCALLLILLVGAL (TLR2 de ratón TM-predicho);
- SEQ ID NO: 10 - RLQDARPSVLECHQAALVSGVCCALLLILLVGALCHHFHGLWYLR (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR2 de ratón);
- 40 SEQ ID NO: 11 - VLLTITIGATMLVLAVTGAF (TLR6 de ratón TM-predicho);
- SEQ ID NO: 12 - DFHMSPLSCDTVLLTITIGATMLVLAVTGAFCLYFDLPWYVR (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR6 de ratón).
- SEQ ID NO: 13 TIISVSVSVIVVSTVAFLIYHFYFHLILI (mTLR4 TM-predicho)
- 45 SEQ ID NO: 14 TIISVSVSVIVVSTVAFLIYHFYFHLILIAGCKKYSRGESY (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR4 de ratón)
- SEQ ID NO: 15 TIIGVSVLSVLVSWAVLVY (hTLR4 + TM-predicho)
- SEQ ID NO: 16 SLNITCQMNKTIIGVSVLSVLVSVYAVLVYKFYFHLMLL (regiones flanqueantes + TM-predichas - TLR4 humano)

- SEQ ID NO: 17 - LLIVTIVATMLVLAVTV (hTLR1 N-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 18 - ALVSGMCCALFLILLTG (hTLR2 N-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 19 - LLTVTIGATMLVLAVTGA (mTLR1 N-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 20 - ALVSGVCCALLLLILLVG (mTLR2 N-term-TM predicho);
- 5 SEQ ID NO: 21 - TIIGVSVLSVLVSWAVLVY (hTLR4 C-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 22 - VSVLSVLWSWAVLVY (hTLR4 C-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 23 - LIVTIGATMLVLAVTVT (hTLR6 N-term-TM predicho);
- SEQ ID NO: 24 - LAVTVTSLCIYLDLPWYLR (C-term-TM predicho + Cito hTLR1);
- SEQ ID NO: 25 - LILLTGVLCHRFHGLW (C-term-TM predicho + Cito hTLR2);
- 10 SEQ ID NO: 26 - LAVTGAFLCLYFDLPW (C-term-TM predicho + Cito mTLR1);
- SEQ ID NO: 27 - LILLVGALCHHFFHGLW (C-term-TM predicho + Cito mTLR2);
- SEQ ID NO: 28 - VVSVAVLVYKFYFHLML (C-term-TM predicho y hTLR4 citoplasmático de flaqueo);
- SEQ ID NO: 29 - AFLIYHFYFHLILIAGC (C-term-TM predicho mTLR4 + cito);
- SEQ ID NO: 30 - VAFLIYHFYFHLILIAG (C-term-TM predicho mTLR4 + cito);
- 15 SEQ ID NO: 31 - HFYFHLELIAGCKKY (C-term-TM predicho mTLR4 + cito);
- SEQ ID NO: 32 - SCDTVLLTVTIGATMLV (N-term-TM predicho mTLR6 + extra);
- SEQ ID NO: 33 - SPLSCDTVLLTVTIGAT (N-term-TM predicho mTLR6 + extra);
- SEQ ID NO: 34 - TVLLTVTIGATMLVLAV (N-term-TM predicho mTLR6 + extra);
- SEQ ID NO: 35 - LVLAVTGAFLCLYFDLP (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- 20 SEQ ID NO: 36 - GAFLCLYFDLPWYVRML (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- SEQ ID NO: 37 - TIGATMLVLAVTGAFLC (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- SEQ ID NO: 38 - MLVLAVTGAFLCLYFDL (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- SEQ ID NO: 39 - MLVLAVTGAFLALYFDL (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- SEQ ID NO: 40 - LVLAVTGAFLCLYFDLP (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- 25 SEQ ID NO: 41 - GAFLCLYFDLPWYVRML (C-term-TM predicho mTLR6 + cito);
- SEQ ID NO: 42 - AVTVTSLCILDLDPWY (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático);
- SEQ ID NO: 43 - SELSCNITLLIVTIGATM (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo extracelular);
- SEQ ID NO: 44 - LAVTGAFLALYFDLPW (C-term-TM predicho + Cito mTLR1 con sustitución de C a A);
- SEQ ID NO: 45 - LAVTGAFLALYFALPW (C-term-TM predicho + Cito mTLR1 con sustituciones de C a A y D a A);
- 30 SEQ ID NO: 46 - LAVTGAFLASYFDLPW (C-term-TM predicho + Cito mTLR1 con sustituciones de C a A y L605S);
- SEQ ID NO: 47 - LILLVGALAHFFHGLW (C-term-TM predicho + Cito mTLR2 con sustitución de C a A);
- SEQ ID NO: 48 - LILLVGALAAAFAGLW (C-term-TM predicho + Cito mTLR2 con sustituciones de C a A y 3H a A)
- SEQ ID NO: 49 - ALVSGVAAAALLLLILLVG (N-term-TM predicho mTLR2 con sustitución de C a A).
- SEQ ID NO: 50 - AFLIYHFYFHLILIAGAAFLIYHFYFHLILIAGXA (C-term-TM predicho mTLR4 predicho con X indica A o S + cito);
- 35 SEQ ID NO: 51 - FLIYXFYFXLILIAGC (mTLR4 de C-term-TM predicho con X indica R, K, H o A + cito);
- SEQ ID NO: 52 - VAFLIY XFYFXLILIAG (mTLR4 de C-term-TM predicho con X indica R, K, H o A + cito);

- SEQ ID NO: 53 - XFYFXLILIA GCKKY (mTLR4 de C-term-TM predicho con X indica R, K, H o A + cito);
- SEQ ID NO: 54 - SADTVLLTVTACDTVLLTVT IGATMLV (mTLR6 de N-term-TM predicho donde S se sustituye por A + extra);
- SEQ ID NO: 55 - SXDTVLLTVT IGATMLV (mTLR6 de N-term-TM predicho con X indica A o S + extra);
- 5 SEQ ID NO: 56 - SCDAVLLAVAIGAAMLV (mTLR6 de N-term-TM predicho con sustitución T a A + extra);
- SEQ ID NO: 57 - APLACDTVLLTVTIGAT (mTLR6 de N-term-TM predicho con sustitución de S a A + extra);
- SEQ ID NO: 58 - TVLLTVTIGATILVLAV (mTLR6 de N-term-TM predicho con sustitución de M a I + extra);
- SEQ ID NO: 59 - LVLAVTGAF LXLYFDLP (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica S o A + cito);
- SEQ ID NO: 60 - LVLAVTGAF LCLYFXLP (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica E o A + cito);
- 10 SEQ ID NO: 61 - GAF LXLYFDLPWYVRML (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica S o A + cito);
- SEQ ID NO: 62 - GAF LCLYFDLPWYVRIL (mTLR6 de C-term-TM predicho con sustitución M a I + cito);
- SEQ ID NO: 63 - TIGATILVLAVTGAF LC (mTLR6 de C-term-TM predicho con sustitución M a I + cito);
- SEQ ID NO: 64 - MLVLAVTGAF LXLYFDL (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica S o A + cito);
- SEQ ID NO: 65 - MLVLAVTGAF LALYFXL (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica E o A + cito);
- 15 SEQ ID NO: 66 - ILVLAVTGAF LALYFDL (mTLR6 de C-term-TM predicho con sustitución M a I + cito);
- SEQ ID NO: 67 - LVLAVTGAF LCLYFXLP (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica E o A + cito);
- SEQ ID NO: 68 - LVLAVTGAF LXLYFDLP (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica S o A + cito);
- SEQ ID NO: 69 - GAF LXLYFDLPWYVRML (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica S o A + cito);
- SEQ ID NO: 70 - GAF LCLYFXLPWYVRML (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica E o A + cito);
- 20 SEQ ID NO: 71 - GAF LCLYFDLPWYVXML (mTLR6 de C-term-TM predicho con X indica K o A + cito);
- SEQ ID NO: 72 - GAF LCLYFDLPWYVRIL (mTLR6 de C-term-TM predicho con sustitución de M a I + cito);
- SEQ ID NO: 73 - VVSVVAVLVYKXYXHLML (hTLR4 de C-term-TM predicho y flanqueante citoplasmático donde X representa F o A);
- SEQ ID NO: 74 - TIGATMLVLAVTVTALCI (hTLR6 de C-term-TM predicho con S sustituido por A);
- 25 SEQ ID NO: 75- KKLIVIVATATMLVLAVTVKK kk (N-term-TM predicho hTLRI) kk;
- SEQ ID NO: 76 - KKL VSGMCCALFLILLTGKK kk (N-term-TM predicho hTLR2) kk;
- SEQ ID NO: 77 - KKLITITIGATMLVLAVTGAKK kk (N-term-TM predicho mTLRI) kk;
- SEQ ID NO: 78 - KKL VSGVCCALLLLILLVGKK kk (N-term-TM predicho mTLR2) kk;
- SEQ ID NO: 79 - KKLAVTVTSLCIYLDLPWYLRKK kk (C-term-TM predicho + Cito hTLRI) kk;
- 30 SEQ ID NO: 80 - KKLILLTGVLCHRFHGLWKK kk (C-term-TM predicho + Cito hTLR2) kk;
- SEQ ID NO: 81 - KKLAVTGAF LCLYFDLPWKK kk (C-term-TM predicho + Cito TLR1 de ratón) kk;
- SEQ ID NO: 82 - KKLILLVGALCHHFFHGLWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLR2) kk;
- SEQ ID NO: 83 - KKLAVTGAF LALYFDLPWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLRI con sustitución de C a A) kk;
- 35 SEQ ID NO: 84 - KKLAVTGAF LALYFALPWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLRI con sustituciones de C a A y D a A) kk;
- SEQ ID NO: 85 - KKLAVTGAF LASYFDLPWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLRI con sustituciones de C a A y L605S kk
- SEQ ID NO: 86 - KKLILLVGALAHFFHGLWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLR2 con sustitución de C a A) kk;

- SEQ ID NO: 87 - KKLILLVGALAAAFAGLWKK kk (C-term-TM predicho + Cito mTLR2 con sustituciones de C a A y 3H a A) kk;
- SEQ ID NO: 88 - KKALVSGVAAAALLLILLVGKK kk (N-term-TM predicho mTLR2 con sustitución de C a A) kk;
- SEQ ID NO: 89 - YHFYFHLILIAGSSKK KKAFLI Y XFYFXLI kk (C-term-TM predicho mTLR4, con X indica R, K, H, A);
- 5 SEQ ID NO: 90 - YHFYFHLILIAGXSKK (mTLR4 de C-term-TM predicho con X indica S o A + Cito) kk;
- SEQ ID NO: 91 - KKAFLIYXFYFXLI kk (mTLR4 de C-term-TM predicho, con X indica R, K, H, A; C1);
- SEQ ID NO: 92 - KKLAVAIGAAMLVLAVAGKK kk (N-term-TM mTLR6 predicho con sustitución T a A) kk;
- SEQ ID NO: 93 - KKLAVTGAFXLXDLPWKK kk (C-term-TM predicho mTLR6 con X indica C, S o A + cito) kk;
- SEQ ID NO: 94 - KKLAVTGAFCLYXLPWKK kk (C-term-TM predicho mTLR6 con X indica D, E o A + cito) kk;
- 10 SEQ ID NO: 95 - KKAFLIYHFYFHLI kk (C-term-TM predicho mTLR4);
- SEQ ID NO: 96 - KKLITIGATMLVLAVTGKK kk (N-term-TM predicho mTLR6) kk;
- SEQ ID NO: 97 - KLLTVT IGATMLVLAV TGKK k (N-term-TM predicho mTLR6) kk;
- SEQ ID NO: 98 - KKTIGVSVLSVLVSVVAVLVYKK kk (predicho-TM hTLR4) kk
- SEQ ID NO: 99 - KKVSVLSVLWSWAVLVYKK kk (C-term-TM predicho-TM hTLR4) kk;
- 15 SEQ ID NO: 100 -KKVLVSWAVLVYKFYFHLMLKK kk (C-term-TM predicho y hTLR4 citoplasmático de flaqueo) kk;
- SEQ ID NO: 101 - KKA^{AV}TVTSLCIYLDLPWYKK (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático) kk
- SEQ ID NO: 102 - KKLIVTIGATMLVLAVTVTKK kxxxxxx (N-term-TM predicho hTLR6) kk;
- SEQ ID NO: 103 - KKVXLXLVXWAVLVYKK kk (C-term-TM predicho hTLR4 donde X representa S o A) kk;
- 20 SEQ ID NO: 104 - KKVSVLSVLVSWAVLVAKK kk (C-term-TM predicho hTLR4 con Y sustituido en A; C5) kk);
- SEQ ID NO: 105 - KKVAVVAVLVYKFYFHLMLKK kk (C-term-TM predicho hTLR4 y flaqueante citoplasmático donde S se sustituye por A) kk;
- SEQ ID NO: 106 - KKVSVVAVLVXKFXFHLMLKK (C-term-TM predicho hTLR4 y flaqueante citoplasmático donde X representa Y o A);
- 25 SEQ ID NO: 107 - KKVSVVAVLVYXFYFXLMLKK (C-term-TM predicho hTLR4 y flaqueante citoplasmático donde X representa H o K o R o A);
- SEQ ID NO: 108 - KKSELSCNITLLIVTIGATMKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular) kk;
- SEQ ID NO: 109 - KKVLA^{AV}TVTSLCIYLDLPWYKK kk (C-term-TM predicho hTLR6) kk;
- 30 SEQ ID NO: 110 - KKSELSCNITLLIVTIGATMKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular donde C está sustituido con A) kk;
- SEQ ID NO: 111 - KXELXCNITLLIVTIGATMLVKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular donde X representa S o A) kk;
- SEQ ID NO: 112 - KKSXLSCNITLLIVTIGATMKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular donde X representa D o E o A) kk;
- 35 SEQ ID NO: 113 - KKSELSCNLXLLFVXIGAXMKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular donde X representa T o A) kk;
- SEQ ID NO: 114 - KKSELSCNITLLIVTIGATAKK kk (N-term-TM predicho hTLR6 con flaqueante extracelular donde M se sustituye por A) kk;
- 40 SEQ ID NO: 115 - KKVLA^{AV}TVTSLAIYLDLPWYKK kk (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático donde C se sustituye por A) kk;
- SEQ ID NO: 116 - KKVLA^{AV}TVTSLCIYXLPWYKK kk (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático donde X representa A o D o E) kk;

SEQ ID NO: 117 - KKVLA V T V T S L C r Y L D L A W Y K K k k (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático donde P se sustituye por A) k k;

SEQ ID NO: 118 - KKVLA V T V T A L C I Y L D L P W Y K K k k (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático donde S se sustituye por A) k k;

- 5 SEQ ID NO: 119 - KKVLA V X V X S L C I Y L D L P W Y K K k k (C-term-TM predicho hTLR6 con flaqueo citoplasmático donde X representa A o T) k k;

SEQ ID NO: 120 - KKVLA V T V T S L C I Y L D L P A Y K K k k (C-term-TM predicho hTLR6 donde W se sustituye por A) k k;

SEQ ID NO: 121 - KKVLA V T V T S L C I Y L D L P W A K K k k (C-term-TM predicho hTLR6 donde Y está sustituido por A) k k;

SEQ ID NO: 122 - K K S V I W S T V A F L I (C-term-TM predicho mTLR4)

- 10 SEQ ID NO: 123 - G L R I L L L K V (el péptido TM central de TCR α)

Materiales y métodos

- 15 (i) Síntesis y purificación de péptidos. Los péptidos se sintetizaron mediante un método de fase sólida de 9-fluorenilmetoxilcarbonyl (Fmoc) en una resina Rink amida MBHA (Calbiochem-novabiochem, San Diego, California) utilizando un sintetizador de péptidos automático ABI 433A (Applied Biosystems, Foster City, CA). La síntesis de péptidos fue seguida por la escisión del péptido de la resina por incubación durante 3 h con 95% de TFA, 2,5% de H₂O y 2,5% de trietilsilano. La purificación del péptido bruto se realizó mediante RP-HPLC (> 98%) en una columna Vydac C4 (Grace Discovery Sciences, Deerfield, IL). La composición de los péptidos se confirmó mediante espectroscopía de masas por electrospray.

- 20 (ii) Cultivo celular - macrófagos. Los ensayos in vitro se realizaron en macrófagos murinos RAW264.7 (ATCC® Número-TIB-71). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de FBS, L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales y antibióticos (Biological Industries, Beit Haemek, Israel). La incubadora se puso a 37°C con una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO₂.

- 25 (iii) Ensayos de citotoxicidad XTT. Se cultivaron 1x10⁴ células (macrófagos murinos RAW264.7, número ATCC® - TIB - 71) por pocillo durante la noche en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, los medios se reemplazaron por 90 μ l de medio de cultivo nuevo y solución tampón de 10 μ l que contenía diferentes concentraciones de los diferentes péptidos mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83). Las concentraciones de péptidos oscilan entre 0,78 y 100 μ M. Las células se incubaron luego durante 2 horas antes de agregar a cada pocillo 50 μ l de solución de reacción de sal interna de 2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil]-2H-tetrazolio-5-carboxanilida (XTT) (Biological Industries). La
- 30 viabilidad se determinó como se describió previamente (Papo et al., 2004 y Papo et al., 2006). La LC₅₀ (la concentración a la que muere el 50% de las células) para cada péptido se obtuvo a partir de las curvas de viabilidad celular dependientes de la dosis.

- (iv) secreción de TNF α por RAW264.7 en respuesta a la activación de TLR. 2x10⁵ células por pocillo se cultivaron durante la noche en placas de 96 pocillos. Al día siguiente, los medios se reemplazaron por DMEM nuevo, incluidos
- 35 todos los suplementos. TLR péptidos mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO:88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) se disolvieron en DMSO y se añadieron a las células en diferentes concentraciones. La concentración final de DMSO fue del 1% para todos los grupos. Las células se incubaron con el péptido durante 2 horas, luego se lavaron dos veces y se incubaron con medio recién preparado que contenía LTA (ácido lipoteicoico, un activador de TLR2) (Sigma-Aldrich) o LPS (lipopolisacárido, un
- 40 activador de TLR4) (Sigma-Aldrich). Las concentraciones de LTA variaron entre los diferentes experimentos. Las células se incubaron durante 5 horas a 37°C, después de lo cual se recogieron muestras de los medios de cada tratamiento y se almacenaron a -20°C. La concentración de TNF α en cada muestra se evaluó usando un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas TNF α de ratón (Bender MedSystems, Almog), de acuerdo con el protocolo de los fabricantes. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

- 45 (v) Marcaje fluorescente de péptidos. Para el marcaje fluorescente, se han utilizado los siguientes fluoróforos: 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F, BioChemika), 4-Fluoro-7-nitro-[2,1,3]-benzoxadiazol (NBD Apollo), 5(6)-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimida éster (Fluoresceína, BioChemika) y 5(6)-carboxitetrametilrodamina N-succinimidil éster (TAMRA, BioChemika). Los péptidos unidos a resina se trataron con cualquiera de los fluoróforos listados disueltos en dimetilformamida (DMF), conduciendo a la formación de péptidos fluoróforos N-terminales
- 50 unidos a la resina. Se añadió DIEA al 2% (Sigma-Aldrich) a las soluciones de TAMRA y fluoresceína. La incubación se realizó durante 1 hora (NBD) o durante la noche (TAMRA y fluoresceína). Después de la incubación, la resina se lavó a fondo con DMF y luego con cloruro de metileno, se secó bajo flujo de nitrógeno, y luego se escindió y se purificó como se describe en (i) anteriormente.

- 55 (vi) Transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) para Fluoresceini/NBD y péptidos marcados con rodamina (TAMRA). Las vesículas unilaminares grandes (LUV) compuestas de fosfatidilcolina (PC) y colesterol

(10:1, p/p) se prepararon usando el método de extrusión como se describió previamente (Cohen et al, 2008). Los experimentos de fluorescencia se realizaron con pares de péptidos utilizando péptidos marcados con fluoresceína como donantes y péptidos marcados con rodamina como aceptores. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron a temperatura ambiente, con excitación ajustada a 494 nm (ranura de 10 nm) y escaneo de emisión a 500-600 nm (ranuras de 10 nm), mediante un espectrofotómetro de fluorescencia Cary eclipse (Varian Inc., Palo Alto, CA). En un experimento típico, se añadió primero un péptido marcado con fluoresceína a partir de una solución madre en DMSO (concentración final de péptido 0,1 uM y DMSO al 0,25% (v/v)) a una solución que contenía PC:LUV de Colesterol (100 µM) en tampón HEPES. Esto fue seguido por la adición sucesiva de péptidos marcados con rodamina hasta una concentración final que oscilaba entre 0,025 y 0,4 µM. Los espectros de fluorescencia se obtuvieron antes y después de la adición de los péptidos marcados con rodamina. Los valores de fluorescencia se corrigieron restando los cambios en la emisión obtenidos al agregar HEPES solamente. Los valores máximos de FRET se obtuvieron calculando los cambios en la emisión del péptido donante a 521 nm.

(vii) Ensayos de unión a membrana. Se añadieron sucesivamente PC:LUV de colesterol a un péptido marcado con NBD 0,1 µM disuelto en agua doblemente destilada. Los cambios en la emisión de NBD (530 nm; ΔF) se controlaron en función de la relación molar lípido/péptido con excitación ajustada a 467 nm (ranura de 10 nm) hasta que el sistema alcanzó el equilibrio. Para tener en cuenta el fondo, se resta la emisión de LUVS solo en la misma longitud de onda. Los cambios en la emisión de la sonda representan la cantidad de péptido unido a la interfaz hidrofóbica, porque se sabe que NBD cambia su emisión en un entorno hidrofóbico (Rapaport et al., 1991) lo que nos permite evaluar la unión del péptido a los LUV. El sistema de los inventores alcanzó el equilibrio de unión (F_{max}) a una cierta relación lípido/péptido, y por lo tanto la constante de afinidad podría calcularse a partir de la relación entre el nivel de equilibrio de la emisión del péptido marcado con NBD y la concentración de lípidos, usando un modelo de afinidad en estado estacionario. Las constantes de afinidad se determinaron así mediante análisis de mínimos cuadrados no lineales (NLLSQ). El ajuste NLLSQ se realizó usando la siguiente ecuación:

$$Y(x) = K_a \cdot X \cdot F_{max} / (1 + K_a \cdot X) \quad (\text{Ec. 1})$$

donde X es la concentración de lípidos, F_{max} es la diferencia máxima en la emisión del péptido marcado con NBD antes y después de la adición de los lípidos (representa el péptido lípido máximo unido o la respuesta de unión al equilibrio), y K_a es la constante de afinidad, en M^{-1} .

(viii) Ensayos de coimmunoprecipitación. Se incubaron $2,5 \times 10^6$ células RAW264.7 (macrófagos murinos, ATCC® Número - TIB - 71) con 0, 5 ó 10 µM de péptidos marcados con rodamina, durante 2 horas a 37°C. Las células con péptido se lavaron y se lisaron con tampón RIPA helado (Tris pH 7,4, 20 mM, NaCl 137 mM, Glicerol 10%, Triton-X 1%, Deoxicolato de sodio 0,5%, SDS 0,1% y cóctel de inhibidor de proteasa dilución 1:100). Después de 15 minutos de centrifugación a 14.000 RPM, 4°C, la fracción soluble se separó y se incubó durante 2 horas con diferentes anticuerpos TLR. Se añadieron perlas de proteína G (Santa Cruz) para una incubación adicional durante la noche. Las perlas se lavaron con PBS frío 5 veces, se diluyeron 1:2 con tampón de tricina SDS (Novex®, Invitrogen) y se hirvieron durante 10 minutos a 95°C. Las muestras se corrieron en un 10% de SDS-PAGE. La presencia del péptido marcado se detectó con un escáner fluorescente Typoohm (GE Healthcare, Waukesha, WI). La excitación se ajustó a 532 nm y la emisión a 585 nm. La detección de las proteínas TLR se realizó mediante análisis de transferencia Western con solución estándar de ECL (Pierce). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti-TLR1 (Santa Cruz), anti-TLR2 (eBioscience) y anti-TLR4 (BioLegend), los anticuerpos secundarios utilizados fueron anti-rata (Santa Cruz).

(ix) Espectroscopía de dicroísmo circular (CD). Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro Aviv 202 (Aviv Instruments, Lakewood, NJ). Los espectros se escanearon usando una cubeta de cuarzo termostática con una longitud de trayectoria de 1 mm. Todas las mediciones se realizaron a 25°C. El registro de tiempo promedio de cada espectro fue de 20 segundos en pasos de 1 nm en el intervalo de longitud de onda de 190-260 nm. Los péptidos fueron escaneados a una concentración de 10 µM (50 µM para TLR1 TM C' solamente) en una solución de liso-fosfatidilcolina al 1% (Sigma Aldrich).

(x) Ensayos de autoensamblaje. Los péptidos marcados con rodamina se disolvieron en DMSO, se agregaron a 400 µl de HEPES o a una solución de PC:colesterol 0,1 mM y se equilibraron (la concentración final de los péptidos era 0,1 µM, DMSO 0,025% v/v). Utilizando un espectrómetro de luminiscencia SLM-Aminco® (SLM-Aminco, Rochester, NY) se siguieron los cambios en la intensidad de la emisión de fluorescencia antes y después de la adición de proteinasa-K (Sigma Aldrich). La longitud de onda de excitación se ajustó a 530 nm, la emisión a 580 nm, la concentración final de proteinasa-K fue 62,5 µg/ml. Un aumento en la fluorescencia indica que el péptido existe como un oligómero (Papo et al., 2002). Todas las medidas de fluorescencia se realizaron a 25°C.

(xi) Estudios in vivo. Para examinar el efecto de los péptidos TLR TM en el choque séptico agudo impulsado por la hiperactivación de TLR2, se han utilizado un modelo murino como se describió previamente (Meng et al., 2004). Brevemente, ratones hembras C57 Black de 12 semanas de edad (suministrados por Harlan) se trataron con 100 µg de LTA inyectado IP en una solución salina (pH 6,5) que contenía 200 µg/ml de D-galactosamina (Calbiochem). Los ratones tratados recibieron dos inyecciones de péptido a dosis de 1, 5 y 10 mg/kg. La primera inyección se administró en el momento de la inyección de LTA, la segunda inyección se administró 2 horas (1 mg/kg) o 12 horas (5 y 10 mg/kg) más tarde. Se controló la supervivencia de los animales durante 96 horas después de la inyección de

LTA. Los péptidos utilizados para los experimentos in vivo se trataron dos veces con ácido acético al 20% con el fin de reemplazar el anión trifluoroacetato añadido durante la purificación por HPLC. Para todos los grupos $n = 8$.

(xii) Líneas celulares: cáncer de próstata. Se usaron varios tipos de líneas celulares de cáncer de próstata (proporcionadas amablemente por el Prof. Zelig Eshhar en el Instituto de Ciencias Weizmann) con características conocidas de dependencia androgénica y capacidad para inducir metástasis. PC3 (ATCC® Número CRL-1435D) y DU145 (ATCC® Número HTB-8 ID) son conocidos como altamente metastásicos e independientes de andrógenos, y se los considera ampliamente como el modelo de línea celular para el cáncer de próstata avanzado. 22RV1 (ATCC® Número CRL-2505D, andrógeno independiente) y LNCaP (ATCC® Número CRL-1740D, andrógeno dependiente) son conocidos como metastásicos bajos.

(xiii) Expresión de TLR en líneas celulares de cáncer de próstata. Se realizaron reacciones de PCR para examinar la presencia de ADNc de TLR 1, 2 y 6 en las cuatro líneas celulares de cáncer de próstata descritas en (xii) anterior, a saber: PC3 y LNCaP (altamente metastásicas) y LNCaP y 22RV1 (poco metastásicas). Se recolectó el ARN total de lisados celulares usando TRI Reagent® (un reactivo completo listo para usar para el aislamiento de ARN total, Applied Biosystems) y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Al hibridar los oligo dTs solo se mantuvo el ARNm de este conjunto de ARN y luego se usaron cebadores específicos para cada gen de TLR. Los cebadores se generaron utilizando las herramientas y la base de datos de PubMed.

(xiv) Actividad de transcripción de NFkB en respuesta a la activación de TLR en líneas celulares de cáncer de próstata. El elemento de respuesta NFkB ha sido ampliamente investigado y se sabe que sirve como una indicación específica para la presencia de la molécula de NFkB dentro del núcleo. Dicha translocación se produce tras la activación de la cascada de señalización de TLR, que conduce a la transcripción dirigida. Este elemento de ADN se introdujo en un plásmido que expresa luciferasa cadena arriba del gen, generando así un plásmido informador para la presencia de NFkB en el núcleo. Las células se transfectaron con el plásmido y 24 horas más tarde se trataron con LPS/LTA para inducir la cascada de señalización a través de TLR4 y TLR2, respectivamente. Para validar la activación, los niveles de expresión de Luc se evaluaron utilizando el kit Steady-Glo (Promega) de acuerdo con las instrucciones de los fabricantes.

Ejemplo 1. Los péptidos correspondientes al extremo N y C del dominio TM de TLR2/1/6 pueden inhibir la secreción de TNF α por los macrófagos RAW264.7 tras la activación de LTA

Con el fin de examinar el papel del dominio transmembrana (TM) en TLR2 y TLR1/6, se identificaron en primer lugar los supuestos dominios de TM de estas proteínas. Los péptidos que tienen las secuencias designadas aquí como SEQ ID NO: 1 a SEQ ID NO: 16, comprenden las secuencias del dominio TM predicho y la TM predicha con regiones citoplasmáticas y extracelulares flanqueantes, respectivamente, para TLR1, 2 y 6 de humano y ratón. Los dominios de TM predichos tienen una longitud de 21 a 22 aminoácidos. Una región hidrofóbica corta es adyacente al dominio TM, desde el lado intracelular. La secuencia de aminoácidos del dominio TM TLR1 y TLR6 es virtualmente idéntica.

Para investigar su papel en la activación de TLR2, se ha utilizado el enfoque de añadir péptidos sintéticos que corresponden a los dominios TM TLR2 o TLR1 y se ha probado su capacidad para afectar la activación de los macrófagos mediante el ácido lipoteicoico (LTA), un activador de TLR2. Este sistema se basa en una gran cantidad de evidencias que muestran que los péptidos TM añadidos exógenamente pueden afectar la actividad de una determinada proteína a través de interacciones con su dominio TM (Bennasroune et al., 2004). Inicialmente, se han diseñado para cada dominio TM de TLR2 y TLR1, dos péptidos superpuestos que contienen ~20 aminoácidos cada uno: uno correspondiente al TM N-terminal y el otro correspondiente a un dominio TM C-terminal extendido (Tabla 1). Se ha elegido extender el dominio TM C-terminal ya que esta región corresponde a una región similar en TLR4 que se ha demostrado que regula la oligomerización de esta proteína. Además, se han sintetizado análogos de estos péptidos con varias sustituciones. En varios péptidos, los restos de cisteína se mutaron a alaninas para facilitar la síntesis, ya que los restos de cisteína dentro de los dominios TM usualmente no afectan la actividad de una proteína de membrana (Tabla 1). Adicionalmente, se agregaron lisinas a los extremos de estos péptidos para mejorar la solubilidad.

Los resultados de los inventores muestran que los péptidos sintéticos derivados de los dominios TM de TLR2 y TLR1, a saber, mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86), mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83), fueron capaces de inhibir significativamente la secreción de TNF α de los macrófagos después de la activación de LTA (Figs. 1A-1D). La inhibición fue dependiente de la dosis, más alta a una concentración de péptido de 10 μ M, y se realizó bajo una baja activación de TLR2. La activación se logró mediante 100 ng/ml de LTA que dio como resultado ~50 pg/ml de secreción de TNF α (Fig. 1A). Sin embargo, en todas las concentraciones de péptido, no se observó ningún efecto sobre la secreción de TNF α inducida por lipopolisacáridos (LPS), un agonista de TLR4 (Fig. 1B).

Tabla 1: Denominaciones del péptido y características

SEQ ID	Péptido	Secuencia	LC50 ¹ (μM)
79	mTLR1 C' TM	kkLAVTGAFLCLYFDLPWkk	>100
77	mTLR1 N' TM	kkLLTVTIGATMLVLAVTGakk	>100
80	mTLR2 C' TM	kkLILLVGALCHHHFGLWkk	50
76	mTLR2 N' TM	kkALVSGVCCALLLLILLVGkk	N.A
83	mTLR1 C' TM (de C a A)	kkLAVTGAFLALYFDLPWkk	50
82	mTLR1 C' TM (de C+D a A)	kkLAVTGAFLALYFALPWkk	N.A
83	mTLR1 C' TM (de C a A + L605S)	kkLAVTGAFLASYFDLPWkk	>100
86	mTLR2 C' TM (de C a A)	kkLILLVGALAHHHFGLWkk	50
85	mTLR2 C' TM (de C+3H a A)	kkLILLVGALAAAFAGLWkk	N.A
88	mTLR2 N' TM (de C a A)	kkALVSGVAAAALLLLILLVGkk	>100

¹LC50 (Concentración letal en la cual mueren el 50% de las células) se presenta para las células RAW264.7

Con el fin de probar si esta inhibición puede tener lugar bajo niveles elevados de activación de TLR2, las células macrófagos se estimularon con 500 ng/ml de LTA, lo que dio como resultado niveles de TNFα de ~500 pg/ml. En estas condiciones, los péptidos TLR TM a 20 μM redujeron la secreción de TNFα en un 40-60% (Fig. 1C). Los péptidos se usaron a concentraciones muy por debajo de sus concentraciones tóxicas (Tabla 1). Tomados en conjunto, estos hallazgos sugieren que el efecto de los péptidos TLR2 y TLR1 es específico para TLR2, ya que no afectaron a la activación de una proteína estrechamente relacionada TLR4 (Fig. 1D). Se agregaron dos controles adicionales para verificar los resultados de estos experimentos. Primero, la adición de los péptidos solos no alteró el nivel basal de secreción de TNFα (resultados no mostrados). En segundo lugar, los péptidos no eran tóxicos para los macrófagos de ratón en las condiciones experimentales de los investigadores como se revela en un ensayo de toxicidad XTT (Tabla 1).

Ejemplo 2. Los experimentos FRET revelan que los péptidos TLR TM tienen una mayor tendencia a formar heterodímeros que los homodímeros

El análisis de Transferencia de Energía de Resonancia de Fluorescencia (FRET) se usó para explorar las interacciones de los péptidos sintéticos TM dentro de vesículas unilameras grandes (LUV). Se usaron LUV de fosfatidilcolina (PC) y colesterol (10:1) para imitar la capa externa de las células de mamífero. Los péptidos TLR1 TM mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) marcados con fluoresceína se usaron como donantes, y sus péptidos contrapartes TLR2 TM mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88), mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) marcado con rodamina como aceptores. La medición de la disminución en la emisión de péptidos conjugados con fluoresceína, después de la adición de cantidades sucesivas de péptidos marcados con rodamina, sirvió como una indicación para la interacción entre un par de péptidos.

Los péptidos TM derivados de TLR1 TM fueron capaces de formar tanto homodímeros como heterodímeros con péptidos TLR2TM (Figs. 2A-2C y 3A-3C). Los péptidos TLR1 TM C-terminal y N-terminal mostraron una propensión mucho más alta hacia la formación de heterodímeros que los homodímeros. El FRET máximo calculado para homodímeros mTLR1 TM C' fue $16,1 \pm 1,9\%$ (Fig. 2B). Los homodímeros mTLR1 TM N' mostraron $14,2 \pm 2,3\%$ de FRET (Fig. 3B) mientras que los heterodímeros mTLR1/2 C' y mTLR1/2 TM N' dieron una disminución máxima de la señal de $20,6 \pm 1,7\%$ y $25,3 \pm 2,0\%$, respectivamente (Figs. 2C y 3C). Se utilizó Cp conjugada con rodamina, el péptido TM central de TCRα (SEQ ID NO: 123) como control negativo y no mostró una disminución significativa de la señal de fluorescencia (Figs. 2A y 3A). Tomados en conjunto, estos hallazgos demuestran la capacidad de las diferentes TM para interactuar entre sí y es coherente con el hecho de que estas proteínas requieren un cambio hacia la heterodimerización para su activación. Los resultados de los inventores FRET sugieren que los dominios TM de estas proteínas también son un factor involucrado en esta transición.

Ejemplo 3. Los péptidos TLR1 TM se unen a las membranas modelo con alta afinidad

Se determinó la capacidad de los péptidos TLR1 TM para unirse a las membranas modelo, ya que esta propiedad es importante para los resultados de los inventores de FRET calculados. Como la fracción de los péptidos unidos a los LUV se correlaciona con la intensidad de la señal de FRET observada, es importante definir este parámetro. Por lo tanto, medir el aumento en la emisión de péptidos conjugados con 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD), después de la adición de cantidades sucesivas de LUV, sirve como una indicación de su afinidad hacia las membranas eucarióticas. La emisión de NBD aumenta con la inserción en un entorno hidrofóbico.

Ambos péptidos marcados mTLR1 TM C'-CtoA y mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 83 y SEQ ID NO: 77, respectivamente) muestran una alta afinidad hacia liposomas de PC:colesterol con valores de K_a de $7,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ y $1,5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}$, respectivamente (Figs. 4A y 4B). Estos valores de K_a relativamente altos indican que los péptidos se unieron completamente a los liposomas en los experimentos de FRET.

- 5 Ejemplo 4. Los péptidos TLR2 TM pueden interactuar físicamente con la proteína TLR1 en lugar de con TLR2 o TLR4.

Para respaldar la presente hipótesis, se han realizado experimentos de coimmunoprecipitación (co-IP) para detectar interacciones de proteínas TLR con péptidos TLR TM. Este enfoque experimental utiliza una sonda fluorescente (rodamina) conjugada con el péptido TLR TM y anticuerpos específicos contra las proteínas TLR. Los lisados
10 celulares con el péptido se incubaron con anticuerpos TLR específicos unidos a perlas de proteína G. Estos complejos fueron luego sometidos a SDS-PAGE. La presencia del péptido fluorescente se verificó mediante un escáner fluorescente y la presencia de TLR precipitados se verificó usando análisis de transferencia Western.

En $10 \mu\text{M}$, tanto los péptidos mTLR2 TM N'-CtoA como mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 86, respectivamente) precipitan significativamente más con anticuerpos de TLR1 en comparación con los anticuerpos
15 TLR2 y TLR4 (Figs. 5A-5B). Estos resultados están de acuerdo con los resultados de FRET y respaldan el modelo de los inventores que sugiere que la proteína TLR1 se asocia preferentemente con los péptidos TLR2 TM. El análisis de transferencia de Western reveló que TLR2/1 y 4 coprecipitan juntos, independientemente de la adición de los péptidos (Fig. 5B). Estos resultados refuerzan aún más la idea de que estas proteínas forman grandes complejos en la membrana plasmática y que son capaces, al menos in vitro, de interactuar entre sí.

- 20 Ejemplo 5. Los péptidos TLR2/1 TM son α -helicoidales y difieren en su capacidad para formar complejos en el entorno de tampón y lípidos.

Con el fin de obtener una mejor comprensión de la relación estructura-función de los péptidos TLR TM, se han determinado sus estructuras en una interfaz de lípidos, así como su capacidad para autoensamblarse. Usando
25 espectroscopia de dicroísmo circular (CD) se determinaron sus estructuras en micelas de lisofosfatidilcolina (LPC). Como se puede ver en las Figs. 6A-6B, mTLR1 TM N' (SEQ ID NO: 77) así como mTLR2 TM N'-CtoA y mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 88 y SEQ ID NO: 86, respectivamente) adoptan un estructura α helicoidal en micelas LPC. La señal obtenida para estos péptidos fue relativamente fuerte ($\Theta = \sim 15\text{-}20 \times 10^{-3} \text{ Grados} \times \text{cm}^2/\text{Decimol}$ a 208 y 222 nm) a una concentración de péptido de $10 \mu\text{M}$.

mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 83) no mostró señal a $10 \mu\text{M}$ y dio solo una débil señal α helicoidal a $50 \mu\text{M}$ (Fig. 6A). Esto sugiere que este péptido tiene un contenido de α hélice inferior que los otros péptidos examinados. Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que la señal baja se deba a estructuras adicionales de lámina β o bajas tasas de inserción.

Además, se ha examinado la capacidad de estos péptidos para autoensamblarse en homooligómeros, ya que se ha demostrado que esta propiedad de los péptidos activos de membrana afecta a su actividad (Rosenfeld et al., 2006b,
35 Rosenfeld et al., 2006c). Se ha probado esta característica, tanto en solución como en una interfaz de membrana. Se ha medido la emisión inicial de péptidos marcados con rodamina a 580 nm solo en solución, o en una solución que contenía LUV de PC:colesterol, y luego se siguió el aumento de la emisión a lo largo del tiempo después de la adición de proteasa K al medio. Un aumento alto y rápido en la fluorescencia a lo largo del tiempo indicó que el péptido conjugado con fluoróforo estaba en un estado oligomérico inactivado. El conocido péptido antimicrobiano
40 oligomérico LL37 (Rosenfeld et al., 2006a) se usó como control positivo.

En la solución HEPES mTLR1 TM N' y mTLR1 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 77 y SEQ ID NO: 83 respectivamente), así como mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) dieron un aumento muy lento en fluorescencia a lo largo del tiempo, sugiriendo que estos péptidos forman oligómeros en solución hasta cierto punto (Fig. 7A). Estos auto-oligómeros
45 pueden ser disociados por tratamiento con proteasa como puede verse por su aumento relativamente lento de emisión. En contraste, mTLR2 TM N'-CtoA (SEQ ID NO: 88) reveló una muy fuerte propensión a formar agregaciones en solución, como puede revelarse por la baja tasa de emisión inicial para este péptido. Estas agregaciones no se disociaron con la adición de proteasa K a la solución (Fig. 7B, línea negra), pero se demostró que se disolvían parcialmente al agregar LUV al sistema (Fig. 7B, línea gris), sugiriendo que en un entorno lipídico, los péptidos mTLR2 TM N'-CtoA favorecen una forma monomérica.

Se vio una imagen diferente en una solución que contenía LUV. Mientras que los péptidos TLR2 TM no mostraron ningún cambio antes y después del tratamiento con proteasa, se demostró que los péptidos TLR1 TM se disocian
50 hasta cierto punto, lo que sugiere que estos péptidos forman homooligómeros en las membranas, hasta cierto punto (Fig. 7C). Estos resultados están claramente en línea con los resultados de los inventores FRET, lo que sugiere que tanto mTLR1 TM N' como mTLR1 TM C'-CtoA pueden autoensamblarse para formar homodímeros. Como se esperaba, el control positivo de LL37 mostró una recuperación de la fluorescencia muy alta y rápida en un entorno lipídico (Fig. 7D), característico de péptidos altamente oligoméricos.

55

Ejemplo 6. Los péptidos basados en el dominio TLR2 TM pueden inhibir la hiperactivación de TLR2 in vivo.

Con el fin de probar la actividad de los péptidos de los inventores in vivo, se ha utilizado un modelo murino para el choque séptico agudo causado por la hiperactivación de TLR2. Los ratones fueron inyectados i.p. con 100 µg de LTA y luego se trataron con el péptido mTLR2 TM C'-CtoA (SEQ ID NO: 86) en diferentes regímenes (véase la sección de materiales y métodos (xi)) o solo con solución salina. Como puede verse en la Fig. 8, la supervivencia de los ratones tratados con solución salina solo disminuyó al 0% dentro de las 48 horas posteriores a la inyección de LTA. En contraste, los ratones tratados con 1 ó 5 mg/kg de péptido mostraron tasas de supervivencia de 50% y 62,5%, respectivamente, hasta 14 días después de la inyección de LTA. Durante todo el experimento, los ratones tratados con el péptido no mostraron efectos adversos notables.

Ejemplo 7. Expresión específica de TLR en líneas celulares de cáncer de próstata metastásico y no metastásico.

Se determinaron los niveles de ARNm de expresión de TLR en varios tipos de líneas celulares de cáncer de próstata: PC3 y DU145 que se conocen como altamente metastásicos y 22RV1 y LNCaP que se conocen como metastásicos bajos (los datos se presentan solo para PC3 y LNCaP). De manera interesante, las células PC3 expresan todos los TLR probados (1, 2 y 6), mientras que en LNCaP, solo se detectaron las transcripciones de ARNm de TLR1, 2 y 6 (Fig. 9). Luego se probaron si estas transcripciones eran realmente funcionales en estas células. Para este fin, se utilizó un ensayo de expresión de luciferasa (Luc) que se basaba en la presencia de NFκB en el núcleo, informando así sobre el producto final de la cascada de señalización de la activación de TLR. La incubación de células PC3 en presencia de LPS (activador de TLR4) o LTA (activador de TLR2) dio como resultado un aumento significativo en la expresión de Luc (Fig. 10).

Ejemplo 8. Un péptido sintético derivado de TMD de TLR2 influye en la activación de las líneas celulares de cáncer de próstata.

Se sintetizaron los péptidos correspondientes a los dominios N-terminal o C-terminal de los dominios TM de los TLR1 humanos, 2 y 5. Cada dominio TM se dividió en dos secuencias superpuestas (Tabla 2). Se realizaron experimentos de actividad y toxicidad en un péptido correspondiente al dominio C-terminal del dominio TM del TLR2 humano, que incluye los 5 aminoácidos adyacentes del dominio intracelular putativo (SEQ ID NO: 83, hTLR2-C en la Tabla 2 a continuación, extendido con dos restos de lisina en cada uno de sus extremos para aumentar la solubilidad). El péptido no era tóxico para las líneas celulares PC3 o LNCaP a una concentración de hasta 100 µM (la concentración máxima probada, datos no mostrados).

Tabla 2: Denominaciones y secuencias de péptidos

SEQ ID NO	Denominación del péptido	Secuencia de péptido ¹
24	hTLR1-C	LAVTVTSLCIYLDLPWYLR
17	hTLR1-N	LLIVTrVATMLVLAVTV
25	hTLR2-C	LILLTGVLCHRFHGLW
18	hTLR2-N	ALVSGMCCALFLLILLTG

Secuencia en negrita - dominio intracelular

El péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) se ensayó luego para determinar su capacidad para inhibir la cascada de señalización de los TLR después de su activación con LTA y LPS. Cuando se activó con LTA en presencia del péptido (20 µM), la expresión de Luc se inhibió en un 40% en las células PC3 (Fig. 10). De manera importante, cuando las células se activaron con LPS, el péptido no pudo inhibir la activación, señalando la especificidad de la inhibición (Fig. 10). Una posible explicación del hecho de que hay una reducción de la línea de base puede deberse a la activación de los TLR a través de la secreción de DAMP por las células de cultivo en condiciones de crecimiento normales.

Una pregunta importante es si la reducción en la activación celular inducida por el péptido mostrado en la Fig. 10 dará como resultado también una tasa reducida de crecimiento celular. De hecho, la incubación de las células con 20 µM de péptido durante 72 horas (se añadió un péptido recién disuelto cada 24 horas), provocó una inhibición del 20% en la proliferación (Fig. 11).

Ejemplo 9. Inhibición de la expresión de citoquinas ARNm por el péptido.

Una de las principales características de las células metastásicas es su capacidad para influir en su entorno debido a la secreción de diversas citocinas. Dos de las citocinas más influyentes son VEGF que induce la formación de vasos sanguíneos, y TGFβ que, p. ej., induce la tolerancia de las células inmunitarias e inhibe la apoptosis. Por lo tanto, se determinó la expresión del ARNm de estas citocinas en las células tras su activación con LPS y LTA y el

efecto del péptido sobre la activación. Curiosamente, solo las células PC3 mostraron un marcado aumento en la expresión del ARNm de la citocina tras la estimulación (Fig. 12). Además, se observó una caída en los niveles de expresión en presencia del péptido hTLR2 TM C' (SEQ ID NO: 83) (Fig. 13). Estos hallazgos nos llevan a la hipótesis de que la presencia de los TLR en las células PC3 contribuye a la gravedad (agresividad) del cáncer y su capacidad para formar metástasis. Por lo tanto, los péptidos TLR TM de la descripción se pueden usar como nuevos biomarcadores de diagnóstico, que pueden indicar la velocidad de crecimiento y la capacidad de las células para formar metástasis.

Ejemplo 10. Correlación entre el nivel de expresión de TLR en células de cáncer de próstata, su funcionalidad y su capacidad para generar metástasis.

El repertorio de TLR expresados en líneas celulares tanto metastásicas como no metastásicas, a nivel de proteínas, se examina por Western blot.

La funcionalidad de los diversos TLR, es decir, su capacidad para secretar citoquinas antiinflamatorias, se prueba mediante su activación mediante los ligandos correspondientes (LTA para TLR1/2/6) y se determina mediante ensayos ELISA.

Ejemplo 11. La activación de los TLR requiere su ensamblaje o heteroensamblaje (TLR1,2 y TLR6/2).

La contribución de los dominios transmembrana (TMD) de los TLRs 1, 2 y 6 al proceso de ensamblaje se examina mediante la búsqueda del ensamblaje de homodímero TMD-TMD y heterodímero en las células vivas. El sistema ToxR-TM-MalE se usa para detectar la homodimerización en bacterias vivas (Langosch et al., 1996; Gerber et al., 2001) y el sistema LexA-TM-MalE para detectar la formación de heterodímeros (Lindner et al., 2006; detalles experimentales en Korazim et al., 2006, Gerber et al., 2004 y Papo et al., 2002).

Los péptidos sintéticos (como se describe en el Ejemplo 8, Tabla 2 anterior) se injertan en los sistemas ToxR-TM-MalE y LexA-TM-MalE para identificar los motivos mínimos de dimerización, así como para identificar secuencias que compiten con el ensamblaje natural. De esta forma, se obtienen los péptidos activos más cortos.

Varios péptidos TLR TMD y sus análogos (mutantes, versión truncada y ácidos grasos conjugados) se sintetizan en base a los resultados de los sistemas ToxR y LexA. El homo y el heteroensamblaje se determinan mediante el uso de diversos métodos biofísicos (los detalles experimentales se dan en Korazim et al., 2006, Gerber et al., 2004 y Papo et al., 2002). Los péptidos se analizan en cuanto a su capacidad para interferir con la dimerización del TMD natural que se inserta dentro de los sistemas ToxR y LexA.

Ejemplo 12. La capacidad de los péptidos sintéticos para inhibir la activación de TLR inducida por sus ligandos naturales (LPS, LTA).

Se usan los péptidos que mostraron efectos significativos sobre el ensamblaje de los TMD de tipo natural en las construcciones ToxR-TM-MalE y LexA-TM-MalE (Ejemplo 11, anterior). La capacidad de los péptidos sintéticos para inhibir la activación de TLR inducida por sus ligandos naturales (LPS, LTA) se examina mediante: (i) la medición de cambios en el estado de activación de NF- κ B (sistema de notificación inducible NF- κ B); (ii) la medición de los cambios en la expresión de moléculas relacionadas pro/antiinflamatorias mediante PCR en tiempo real (RT-PCR) o análisis de microarrays (solo en unos pocos casos específicos); y (iii) después de la secreción de citoquinas proinflamatorias TGF- β , IL-10, IL-8 y VEGF mediante ELISA. Los resultados se normalizan con la actividad del ligando natural de TLR (LPS, LTA) o con células no estimuladas.

Las células de cáncer de próstata examinadas incluyen líneas celulares humanas dependientes de andrógenos (AD) e independientes (AI): (i) células PC humanas CL1 (un subclón AI de LNCaP, que se generó cultivando AD LNCaP); (ii) células de PC humano 22RV1 (subclones AI de AD CWR22): PSA⁺, metastásico, cepa ATCC; (iii) PC-3: AI, PSA⁺, metastásico, cepa ATCC; (iv) DU-145: AI, PSA⁺, metastásico, cepa ATCC, (v) CWR22: AD, PSA⁻, células primarias de cáncer de próstata; (vi) WISH-2: AI, PSA⁻, carcinoma de células pequeñas de la próstata.

La próstata humana normal y otras células no cancerosas incluyen: (i) CRL-1609: células epiteliales de células prostáticas humanas adultas histológicamente normales: AD, PSA⁺; metastásico, cepa ATCC; (ii) fibroblastos normales 3T3; (iii) fibroblastos de prepucio OL; (iv) linfocitos humanos; (v) RBC humanos.

Ejemplo 13. La actividad anticancerígena de los péptidos sintéticos in vivo.

Se generan xenoinjertos de próstata con ratones desnudos con el fin de probar la actividad anticancerígena de los péptidos sintéticos (Tabla 2) aplicándolos intratumor, IP o IV. El efecto sobre el microambiente se prueba detectando las principales citoquinas y quimiocinas secretadas en esta área, así como caracterizando la población de células que entran en las proximidades del tumor, p. ej., T-regs, MDSC, etc.

Ejemplo 14. Los péptidos transmembrana derivados de TLR4 y TLR6 son capaces de hetero-dimerización.

Dado que en el caso de la enfermedad de Alzheimer, la hipótesis de trabajo es que TLR4 y TLR6 se heterodimerizan, se investigó el papel de los TTM en su activación. Los péptidos derivados de los TMD de estos

receptores se sintetizaron y purificaron en el laboratorio de los inventores mediante procedimientos estándar.

Con el fin de investigar la hetero-dimerización en la membrana de las células vivas, se usan dos sistemas reporteros diferentes. Para detectar la homo-dimerización de los dominios TM, se emplea el sistema ToxR que se usa de manera rutinaria en el laboratorio de los inventores (véase más arriba). También se construyó un nuevo sistema modificado para detectar la hetero-dimerización dentro de los dominios TM por el sistema reportero GALLEX, un sistema 2-híbrido en *E. coli* para detectar segmentos TM hetero-dimerizantes (Schneider, D. y Engelman, D.M. (2003) GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J Biol Chem* 278, 3105-3111). El Profesor Dirk Schneider de la Universidad de Maguncia, Alemania, proporcionó amablemente este sistema y las pautas para usarlo. Estos sistemas permiten seleccionar una variedad de regiones TM y mutantes de los TLR 4 y 6, con el fin de identificar las regiones dentro del TMD que son importantes para la hetero-dimerización. Usando este sistema informador, se pueden identificar los restos de aminoácidos que contribuyen principalmente a la heterodimerización y finalmente los péptidos más eficaces para inhibir la dimerización que conduce a la activación de las células del sistema inmune innato y a la secreción de mediadores proinflamatorios.

Los péptidos se investigaron por su capacidad de ensamblarse conjuntamente en membranas. Para tal fin, se marcaron los péptidos TLR TM con fluoruro de 4-cloro-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol [nitrobenzoxadiazol (NBD)-F de Apollos] y rodamina. Para imitar el entorno de la membrana, se utilizaron vesículas unilaminares grandes (LUV) compuestas de fosfatidilcolina (PC) y colesterol (Chol) (10:1, p/p). Se realizaron experimentos FRET utilizando el péptido TLR4 marcado con NBD como donador de energía y el péptido TLR6 marcado con rodamina como un aceptor de energía. La figura 14 demuestra un fuerte FRET que apoya la hipótesis de trabajo de los inventores.

La Figura 15 muestra la actividad de dimerización de los diferentes segmentos de transmembrana TLR4 y TLR6 usando un sistema de ensamblaje GALLEX, un sistema de dos híbridos para seguir la heterodimerización de proteínas de membrana en la membrana interna de *Escherichia coli*. El método se basa en la represión de la actividad de un gen informador por dos dominios de unión de ADN LexA con diferentes especificidades de unión al ADN. Cuando se acopla a los dominios transmembrana, la asociación heterodimérica se informa mediante la represión de la síntesis de β -galactosidasa.

La dimerización se demostró en comparación con una glicoforina A mutante, GPA, G83I, que es deficiente en su capacidad para formar dímeros y el control positivo, GPA. En este ensayo, una señal baja indica dimerización (como en las primeras tres barras de la izquierda y el control positivo, GPA) y una señal relativamente alta indica incapacidad para formar dímeros.

Ejemplo 16. Los péptidos transmembrana derivados de TLR4 y TLR6 son capaces de inhibir la activación de los TLR de macrófagos.

Se ha demostrado que los TLR se activan en estado heterodimérico. Por lo tanto, se ha estudiado la capacidad de los péptidos de TLR4 C1 (SEQ ID NO: 95); TLR 4 C2 (SEQ ID NO: 90); TLR6 C9 (SEQ ID NO: 83); TLR6 N6 (SEQ ID NO: 96) para regular el hetero-ensamblaje de TLR4 y TLR6, dando como resultado la activación de la línea de células de macrófagos de ratón. La activación del macrófago se comprometió por los niveles de secreción de la citoquina proinflamatoria, TNF- α . Este experimento se realizó en macrófagos ya que su participación en la secreción de mediadores proinflamatorios en la enfermedad de Alzheimer se describió previamente.

Como se muestra en la Figura 16, la adición de los péptidos solubles TLR6 y TLR4 TM inhibió la activación de los macrófagos después de la estimulación con fA β .

Ejemplo 17. Estudios funcionales con los péptidos sintéticos.

Los péptidos TLR4 y TLR6 se analizan adicionalmente por su capacidad para alterar la actividad del receptor de longitud completa y para servir como nuevos inhibidores de la activación de macrófagos y/o células de microglia por β -amiloide fibrilar. Esto se examina mediante varios métodos experimentales en presencia y ausencia de péptidos. Los métodos incluyen:

(1) Seguir los cambios en el estado de activación de NF- κ B después de la estimulación con fA β . Las células HEK293 se cotransfectaron con el gen indicador de luciferasa TLR4, TLR6 y NF- κ B. Después de la estimulación con ligando, las células se lisan y la actividad del gen informador se mide usando el sistema informador de ensayo de luciferasa dual. Este sistema permite determinar el nivel de activación de los diferentes péptidos que resulta en la disminución de la luciferasa en comparación con las células no tratadas. Además, el uso de células con diferentes genotipos permite estimar la especificidad del sistema;

(2) Seguir los cambios en la expresión de moléculas relacionadas con la proinflamación mediante RT-PCR;

(3) Seguir la secreción de citoquinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β e IL-6 mediante ELISA.

En todos los experimentos, el efecto de los péptidos se normaliza a las células no estimuladas. Primero se usaron los macrófagos de ratón RAW264.7 y luego se repitió este ensayo usando células de microglia BV-2 murinas.

Finalmente, se utilizó un ensayo de neurotoxicidad para evaluar la neurotoxicidad inducida por microglia utilizando células neuronales de ratón, tipo natural y microglía de eliminación (TLR4^{-/-}, TLR6^{-/-}). La supervivencia neuronal se calcula utilizando un microscopio confocal después de 72 h de incubación con FAB. La medición de ROS y NO se realizará mediante un ensayo de reducción con nitroazul de tetrazolio (NBT) y la reacción de Griess determinará el óxido nítrico.

Con el fin de examinar la capacidad de los péptidos derivados de TMD para inhibir la secreción de NO, se cultivan 1x10⁵ células por pocillo durante la noche en una placa de 96 pocillos. Al día siguiente, los medios se reemplazan por DMEM nuevo, incluidos todos los suplementos y péptidos TLR disueltos en DMSO se agregan a las células en diferentes concentraciones. La concentración final de DMSO es del 1% para todos los grupos. Las células se incuban con el péptido durante 2 horas, luego se lavan dos veces y se incuban con medio recién preparado que contiene 10 µM de amiloide beta fibrilar durante 5 a 24 horas a 37°C, después de lo cual se recogen muestras de los medios de cada tratamiento y se usan inmediatamente en el kit.

El sistema de reactivo de Griess (Promega) detecta el NO₂ y se basa en la reacción química que utiliza sulfanilamida y dihidrocloruro de N-1-naftiletildiamina.

Ejemplo 18. Evaluación de la eficacia terapéutica de los péptidos de los dominios Tm TLR4 y TLR6 en el modelo de ratones TgCRND8 para la enfermedad de Alzheimer.

Los ratones transgénicos de proteína precursora amiloide TgCRND8 se tratan con péptidos derivados de los dominios TM TLR4 y TLR6 para hasta 24 tratamientos IP, IV e intracraneal y se monitoriza la tasa de desarrollo de la enfermedad de Alzheimer; mediante la formación de placas de núcleo amiloide y estudios de comportamiento, adicionalmente, se realiza tinción inmunohistológica para IL-1β, TNFα e IL-6 para evaluar los niveles de activación de microglia in vivo.

Referencias

Bennasroune, A., Fickova, M., Gardin, A., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Cremel, G. & Hubert, P. (2004) *Mol Biol Cell* 15, 3464-74.

Cohen, T., Pevsner-Fischer, M., Cohen, N., Cohen, I. R. & Shai, Y. (2008) *Biochemistry* 47, 4826-4833.

Fassbender K, Walter S, Kuhl S, Landmann R, Ishii K, Bertsch T, Stalder A, Muehlhauser F, Liu Y, Ulmer A, Rivest S, Lentschat A, Gulbins E, Jucker M, Stafenbiel M, Brechtel K, Walter J, Multhaup G, Penke B, Adachi Y, Hartmann T, Beyreuther K (2004) The LPS receptor (CD14) links innate immunity with Alzheimer's disease. *FASEB J* 18:203-205.

Foster, S. L. & Medzhitov, R. (2009) *Clin Immunol* 130, 7-15.

Frillingos, S., Sahin-Toth, M., Wu, J., and Kaback, H. R. (1998). Cys-scanning mutagenesis: a novel approach to structure function relationships in polytopic membrane proteins. *Faseb J* 12, 1281-1299.

Gerber, D. & Shai, Y. (2001) In vivo detection of hetero-association of glycophorin-A and its mutants within the membrane. *J. Biol. Chem.* 276, 31229-31232.

Gerber D, Pritsker M, Gunther-Ausborn S, Johnson B, Blumenthal R, Shai Y. (2004) Inhibition of HIV-1 envelope glycoprotein-mediated cell fusion by a DL-amino acid-containing fusion peptide: possible recognition of the fusion complex. *J Biol Chem*, 279(46), 48224-30.

Hajjar, A. M., O'Mahony, D. S., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Aderem, A., Klebanoff, S. J. & Wilson, C. B. (2001). Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulin. *J Immunol* 166, 15-9.

He, M. M., Sun, J., and Kaback, H. R. (1996). Cysteine-scanning mutagenesis of transmembrane domain XII and the flanking periplasmic loop in the lactose permease of *EScherichia coli*. *Biochemistry* 35, 12909-12914.

Huang, B., Zhao, J., Shen, S., Li, H., He, K. L., Shen, G. X., Mayer, L., Unkeless, J., Li, D., Yuan, Y., Zhang, G. M., Xiong, H. & Feng, Z. H. (2007) *Cancer Res* 67, 4346-52.

Huang, B., Zhao, J., Li, H., He, K. L., Chen, Y., Chen, S. H., Mayer, L., Unkeless, J. C. & Xiong, H. (2005). Toll-like receptors on tumor cells facilitate evasion of immune surveillance. *Cancer Res* 65, 5009-14.

Jin, M. S., Kim, S. E., Heo, J. Y., Lee, M. E., Kim, H. M., Paik, S. G., Lee, H. & Lee, J. O. (2007). Crystal structure of the TLR1-TLR2 heterodimer induced by binding of a tri-acylated lipopeptide. *Cell* 130, 1071-1082.

Kajita, E., Nishiya, T. & Miwa, S. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 343, 578-84.

Korazim, O., K. Sackett, and Y. Shai, (2006) Functional and structural characterization of HIV-1 gp41 ectodomain regions in phospholipid membranes suggests that the fusion-active conformation is extended. *J Mol Biol.* 364(5),

1103-17.

Kundu, S. D., Lee, C., Billips, B. K., Habermacher, G. M., Zhang, Q., Liu, V., Wong, L. Y., Klumpp, D. J. & Thumbikat, P. (2008). The toll-like receptor pathway: a novel mechanism of infection-induced carcinogenesis of prostate epithelial cells. *Prostate* 68, 223-9.

- 5 Langosch, D., Brosig, B., Kolmar, H. & Fritz, H. J. (1996). Dimerisation of the glycoporphin A transmembrane segment in membranes probed with the ToxR transcription activator. *J. Mol. Biol.* 263, 525-530.

Lee, H. K., Dunzendorfer, S. & Tobias, P. S. (2004). Cytoplasmic domain-mediated dimerizations of toll-like receptor 4 observed by beta-lactamase enzyme fragment complementation. *J Biol Chem* 279, 10564-74.

- 10 Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ, Vartanian T (2003) Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8514-8519.

Lindner, E. & Langosch, D. (2006). A ToxR-based dominant-negative system to investigate heterotypic transmembrane domain interactions. *Proteins* 65, 803-807.

Mendrola, J. M., Berger, M. B., King, M. C. & Lemmon, M. A. (2002) *J Biol Chem* 277, 4704-12.

- 15 Meng, G., Rutz, M., Schiemann, M., Metzger, J., Grabiec, A., Schwandner, R., Luppa, P. B., Ebel, F., Busch, D. H., Bauer, S., Wagner, H. & Kirschning, C. J. (2004) *J Clin Invest* 113, 1473-81.

Mitchell, J. A., Paul-Clark, M. J., Clarke, G. W., McMaster, S. K. & Cartwright, N. (2007) *J Endocrinol* 193, 323-30.

Nishiya, T., Kajita, E. & Miwa, S. (2006) *Biochem Biophys Res Commun* 341, 1128-34.

O'Neill, L. A. & Bowie, A. G. (2007) *Nat Rev Immunol* 7, 353-64.

- 20 Ozinsky, A., Underhill, D. M., Fontenot, J. D., Hajjar, A. M., Smith, K. D., Wilson, C. B., Schroeder, L. & Aderem, A. (2000). The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13766-71.

Papo, N., Seger, D., Makovitzki, A., Kalchenko, V., Eshhar, Z., Degani, H. & Shai, Y. (2006) *Cancer Research* 66, 5371-5378.

- 25 Papo, N., Braunstein, A., Eshhar, Z. & Shai, Y. (2004) *Cancer Research* 64, 5779-5786.

Papo, N., Oren, Z., Pag, U., Sahl, H. G. & Shai, Y. (2002) *Journal of Biological Chemistry* 277, 33913-33921.

Quintana, F. J., Gerber, D., Bloch, I., Cohen, I. R. & Shai, Y. (2007) *Biochemistry* 46, 2317-25.

Rapaport, D. & Shai, Y. (1991) *Journal of Biological Chemistry* 266, 23769-23775.

Rolls, A., Shechter, R., London, A., Ziv, Y., Ronen, A., Levy, R. & Schwartz, M. (2007) *Nat Cell Biol* 9, 1081-8.

- 30 Rosenfeld, Y., Papo, N. & Shai, Y. (2006a) *J Biol Chem* 281, 1636-43.

Rosenfeld, Y., Barra, D., Simmaco, M., Shai, Y. & Mangoni, M. L. (2006b) *J Biol Chem* 281, 28565-74.

Rosenfeld, Y. & Shai, Y. (2006c) *Biochim Biophys Acta* 1758, 1513-22.

Russ, W. P. & Engelman, D. M. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 863-8.

- 35 Saenz-Abad, D., Letona-Carbajo, S., Benito-Arevalo, J. L., Sanioaquin-Conde, I. & Ruiz-Ruiz, F. J. (2008). Prostatic tuberculosis: case report. *Sao Paulo Med J* 126, 227-8.

Sal-Man, N., Gerber, D. & Shai, Y. (2005) *J Biol Chem* 280, 27449-57.

Sal-Man, N., Gerber, D. & Shai, Y. (2004) *Biochemistry* 43, 2309-13.

Sato, Y., Goto, Y., Narita, N. & Hoon, D. S. (2009). Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. *Cancer Microenviron* 2 Suppl 1,205-14.

- 40 Sfanos, K. S. & Isaacs, W. B. (2008). An evaluation of PCR primer sets used for detection of *Propionibacterium acnes* in prostate tissue samples. *Prostate* 68, 1492-5.

Shi, H., Kokoeva, M. V., Inouye, K., Tzamelis, I., Yin, H. & Flier, J. S. (2006) *J Clin Invest* 116, 3015-25.

Sung-Chun Tanga,b,c, Justin D. Lathiaa, Pradeep K. Selvarajf, Dong-Gyu Joa,d, Mohamed R.Mughala, Aiwu

Chenga, Dominic A. Silera, William R. Markesbery, Thiruma V. Arumugamf, and Mark. P. Mattsona.g,(2008) Toll-Like Receptor-4 Mediates Neuronal Apoptosis Induced by Amyloid β -Peptide and the Membrane Lipid Peroxidation Product 4-Hydroxynonenal. Exp Neurol. 213(1): 114-121.

5 Stewart CR, Stuart LM, Wilkinson K, van Gils JM, Deng J, Halle A, Rayner KJ, Boyer L, Zhong R, Frazier WA, Lacy-Hulbert A, El Khoury J, Golenbock DT, Moore KJ.(2010) 3.CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. Nat Immunol.11(2):155-61.

Walter S, Letiembre M, Liu Y, Heine H, Penke B, Hao W, Bode B, Manietta N, Walter J, Schulz-Schaeffer W, Fassbender K (2007) Role of the Toll-like receptor 4 in neuro-inflammation in Alzheimer's disease. Cell Physiol Biochem 20:947-956.

10 **Listado de secuencias**

<110> Yeda Research and Development Co. Ltd Shai, Yechiel Fink, Avner Reuven, Eliran-Moshe

<120> Péptidos basados en el dominio de transmembrana de un receptor tipo toll (TLR) para el tratamiento de enfermedades mediadas por TLR

<130> YEDA-111 PCT

15 <150> 61/365,559
<151> 2010-07-19

<160> 123

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

20 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 1

Leu	Leu	Ile	Val	Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Thr
1				5					10					15	

Val	Thr	Ser	Leu	Cys
			20	

<210> 2

<211> 40

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 2

Asp	Phe	His	Met	Ser	Glu	Leu	Ser	Cys	Asn	Ile	Thr	Leu	Leu	Ile	Val
1				5					10					15	

Thr	Ile	Val	Ala	Thr	Met	Leu	Val	Leu	Ala	Val	Thr	Val	Thr	Ser	Leu
			20					25					30		

Cys	Ile	Tyr	Leu	Asp	Leu	Pro	Trp
		35					40

35 <210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 3

Ala Leu Val Ser Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Thr Gly Val Leu Cys His
20

<210> 4

5 <211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10 <400> 4

Asp Val Arg Leu Ser Val Ser Glu Cys His Arg Thr Ala Leu Val Ser
1 5 10 15

Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu
20 25 30

Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp
35 40

<210> 5

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 5

Leu Leu Ile Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr
1 5 10 15

Val Thr Ser Leu Cys
20

20 <210> 6

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 6

Asp Phe His Met Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val
1 5 10 15

Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu
20 25 30

Cys Ile Tyr Leu Asp Leu Pro Trp
35 40

30 <210> 7

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 7

Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val
1 5 10 15

Thr Gly Ala Phe Leu
20

<210> 8

5 <211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10 <400> 8

Asp Phe His Met Ser Pro Leu Ser Cys Asp Thr Val Leu Leu Thr Val
1 5 10 15

Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu
20 25 30

Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg
35 40

<210> 9

<211> 21

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 9

Ala Ala Leu Val Ser Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu
1 5 10 15

Leu Val Gly Ala Leu
20

20 <210> 10

<211> 46

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 10

Arg Leu Gln Asp Ala Arg Pro Ser Val Leu Glu Cys His Gln Ala Ala
1 5 10 15

Leu Val Ser Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu Val
20 25 30

Gly Ala Leu Cys His His Phe His Gly Leu Trp Tyr Leu Arg
35 40 45

<210> 11

<211> 21

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 11

Val Leu Leu Thr Ile Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val
1 5 10 15

Thr Gly Ala Phe Leu
20

5 <210> 12

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> péptido sintético

<400> 12

Asp Phe His Met Ser Pro Leu Ser Cys Asp Thr Val Leu Leu Thr Ile
1 5 10 15

Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu
20 25 30

Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg
35 40

<210> 13

<211> 30

15 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 13

Thr Ile Ile Ser Val Ser Val Val Ser Val Ile Val Val Ser Thr Val
1 5 10 15

20 Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile
20 25 30

<210> 14

<211> 43

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

25 <220>

<223> péptido sintético

<400> 14

Thr Ile Ile Ser Val Ser Val Val Ser Val Ile Val Val Ser Thr Val
1 5 10 15

Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala Gly
20 25 30

Cys Lys Lys Tyr Ser Arg Gly Glu Ser Ile Tyr
35 40

<210> 15

30 <211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 15
 Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val
 1 5 10 15

Ala Val Leu Val Tyr
 20

5 <210> 16
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> péptido sintético

<400> 16
 Ser Leu Asn Ile Thr Cys Gln Met Asn Lys Thr Ile Ile Gly Val Ser
 1 5 10 15

Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys
 20 25 30

Phe Tyr Phe His Leu Met Leu Leu
 35 40

<210> 17
 <211> 17
 15 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 17
 Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr
 1 5 10 15

20 Val

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

25 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 18
 Ala Leu Val Ser Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile Leu Leu
 1 5 10 15

Thr Gly

<210> 19
 30 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

35 <400> 19

Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr
1 5 10 15

Gly Ala

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 20

Ala Leu Val Ser Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Val Gly

10 <210> 21

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 21

Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val
1 5 10 15

Ala Val Leu Val Tyr
20

<210> 22

<211> 17

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 22

Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val
1 5 10 15

25 Tyr

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<400> 23

Leu Ile Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Val
1 5 10 15

Thr

<210> 24

35 <211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 24
 Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp Leu Pro Trp
 1 5 10 15

5 Tyr Leu Arg

<210> 25
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 25
 Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu Cys His Arg Phe His Gly Leu Trp
 1 5 10 15

15 <210> 26
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

20 <400> 26
 Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp
 1 5 10 15

<210> 27
 <211> 16
 <212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 27
 Leu Ile Leu Leu Val Gly Ala Leu Cys His His Phe His Gly Leu Trp
 1 5 10 15

30 <210> 28
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> péptido sintético

<400> 28
 Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe Tyr Phe His Leu
 1 5 10 15

Met Leu

<210> 29
 <211> 17
 <212> PRT

40 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 29

Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

Cys

<210> 30

<211> 17

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 30

Val Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala
1 5 10 15

10 Gly

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 31

His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala Gly Cys Lys Lys Tyr
1 5 10 15

20 <210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 32

Ser Cys Asp Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu
1 5 10 15

Val

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

30 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 33

Ser Pro Leu Ser Cys Asp Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala
1 5 10 15

Thr

35 <210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 34

Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Val

<210> 35

5 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

10 <400> 35

Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 36

Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Met
1 5 10 15

Leu

20 <210> 37

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> péptido sintético

<400> 37

Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu
1 5 10 15

Cys

<210> 38

<211> 17

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> MLVLAVTGAFLCLYFDL

<400> 38

35 Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Leu

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 39
 Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Leu
 10 <210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <400> 40
 Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15
 Pro
 <210> 41
 <211> 17
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 41
 Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Met
 1 5 10 15
 Leu
 25 <210> 42
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> péptido sintético
 <400> 42
 Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp Leu Pro Trp Tyr
 1 5 10 15
 <210> 43
 <211> 18
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 43
 Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile Gly Ala
 1 5 10 15
 40 Thr Met

Ala Leu Val Ser Gly Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile Leu Leu
1 5 10 15

Val Gly

<210> 50
<211> 35
<212> PRT
5 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
10 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (34)..(34)
<223> X indica A o S

<400> 50
Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala Gly
1 5 10 15

Ala Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala
20 25 30

Gly Xaa Ala
15 35

<210> 51
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
20 <223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
25 <223> X indica R,K,H o A

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (9) .. (9)
<223> X indica R,K,H o A

<400> 51
Phe Leu Ile Tyr Xaa Phe Tyr Phe Xaa Leu Ile Leu Ile Ala Gly Cys
1 5 10 15

<210> 52
<211> 17
<212> PRT
35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético

<220>
40 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (7)..(7)
<223> X indica R,K,H o A

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (11)..(11)
<223> X indica R,K,H o A

<400> 52
Val Ala Phe Leu Ile Tyr Xaa Phe Tyr Phe Xaa Leu Ile Leu Ile Ala
1 5 10 15

Gly

5 <210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> péptido sintético

<220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (1)..(1)
<223> X indica R,K,H o A

15 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (5)..(5)
<223> X indica R, K, H o A

<400> 53
Xaa Phe Tyr Phe Xaa Leu Ile Leu Ile Ala Gly Cys Lys Lys Tyr
20 1 5 10 15

<210> 54
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

25 <220>
<223> péptido sintético

<400> 54
Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ala Cys Asp Thr Val Leu
1 5 10 15

Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val
20 25

30 <210> 55
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético

35 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (2)..(2)
<223> X indica A o S

<400> 55
Ser Xaa Asp Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu
1 5 10 15

40 Val
<210> 56
<211> 17

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 5 <400> 56
 Ser Cys Asp Ala Val Leu Leu Ala Val Ala Ile Gly Ala Ala Met Leu
 1 5 10 15

 Val
 <210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 57
 Ala Pro Leu Ala Cys Asp Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala
 1 5 10 15

 Thr
 15 <210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> péptido sintético

 <400> 58
 Thr Val Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Ile Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

 Val
 <210> 59
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X indica S o A

 <400> 59
 Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15

 Pro
 35 <210> 60
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 40 <223> péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> X indica E o A

5 <400> 60
 Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Xaa Leu
 1 5 10 15

Pro
 <210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (5)..(5)
 <223> X indica S o A
 <400> 61
 Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Met
 1 5 10 15

Leu
 20 <210> 62
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético

25 <400> 62
 Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Ile
 1 5 10 15

Leu
 30 <210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 63
 Thr Ile Gly Ala Thr Ile Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu
 1 5 10 15

Cys
 35 <210> 64
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 40 <223> péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X indica S o A

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (12)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 64
 Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

10 Leu
 <210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (16)..(16)
 20 <223> X indica E o A

<400> 65
 Met Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Xaa
 1 5 10 15

Leu
 <210> 66
 <211> 17
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

<400> 66
 Ile Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Asp
 1 5 10 15

30 Leu
 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

35 <220>
 <223> péptido sintético

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (15)..(15)
 40 <223> X indica E o A

<400> 67

Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Xaa Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 68

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

10 <222> (11)..(11)

<223> X indica S o A

<400> 68

Leu Val Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

Pro

<210> 69

15 <211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (5)..(5)

<223> X indica S o A

<400> 69

Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Met
1 5 10 15

25 Leu

<210> 70

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> péptido sintético

<220>

<221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (9) .. (9)

35 <223> X indica E o A

<400> 70

Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Xaa Leu Pro Trp Tyr Val Arg Met
1 5 10 15

Leu

40 <210> 71

<211> 17

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético

```

5  <220>
    <221> característica_misc
    <222> (15)..(15)
    <223> x is K o A

    <400> 71
    Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Xaa Met
    1          5          10          15

```

10 **Leu**

 <210> 72

 <211> 17

 <212> PRT

 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> péptido sintético

<400> 72
Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu Pro Trp Tyr Val Arg Ile
1 5 10 15

Leu

20

<210> 73
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> péptido sintético

25 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> X representa F o A

30 <220>
<221> CARACTERÍSTICA_MISC
<222> (14)..(14)
<223> X representa F o A

<400> 73
Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Xaa Tyr Xaa His Leu
1 5 10 15

Met Leu

35 <210> 74
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40 <220>
<223> péptido sintético

<400> 74

Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ala Leu
1 5 10 15

Cys Ile

<210> 75

<211> 21

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 75

Lys Lys Leu Leu Ile Val Thr Ile Val Ala Thr Met Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Val Thr Val Lys Lys
20

10 <210> 76

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 76

Lys Lys Ala Leu Val Ser Gly Met Cys Cys Ala Leu Phe Leu Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Thr Gly Lys Lys
20

<210> 77

<211> 22

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 77

Lys Lys Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala
1 5 10 15

Val Thr Gly Ala Lys Lys
20

25

<210> 78

<211> 22

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

30 <223> péptido sintético

<400> 78

Lys Lys Ala Leu Val Ser Gly Val Cys Cys Ala Leu Leu Leu Leu Ile
1 5 10 15

Leu Leu Val Gly Lys Lys
20

<210> 79

<211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> péptido sintético

 <400> 79
 Lys Lys Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp Leu
 1 5 10 15

 Pro Trp Tyr Leu Arg Lys Lys
 20

 <210> 80
 <211> 20
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 80
 Lys Lys Leu Ile Leu Leu Thr Gly Val Leu Cys His Arg Phe His Gly
 1 5 10 15

 Leu Trp Lys Lys
 20
 15

 <210> 81
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 81
 Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Phe Asp Leu
 1 5 10 15

 Pro Trp Lys Lys
 20

 <210> 82
 25 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 30 <400> 82
 Lys Lys Leu Ile Leu Leu Val Gly Ala Leu Cys His His Phe His Gly
 1 5 10 15

 Leu Trp Lys Lys
 20

 <210> 83
 <211> 20
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 83

Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

Pro Trp Lys Lys
20

<210> 84

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 84

Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Leu Tyr Phe Ala Leu
1 5 10 15

Pro Trp Lys Lys
20

10

<210> 85

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> péptido sintético

<400> 85

Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Ala Ser Tyr Phe Asp Leu
1 5 10 15

Pro Trp Lys Lys
20

<210> 86

20

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

25 <400> 86

Lys Lys Leu Ile Leu Leu Val Gly Ala Leu Ala His His Phe His Gly
1 5 10 15

Leu Trp Lys Lys
20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

30

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 87

Lys Lys Leu Ile Leu Leu Val Gly Ala Leu Ala Ala Ala Phe Ala Gly
1 5 10 15

35

Leu Trp Lys Lys
20

<210> 88
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 88
 Lys Lys Ala Leu Val Ser Gly Val Ala Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Leu Leu Val Gly Lys Lys
 20
 10 <210> 89
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (8)..(8)
 <223> X indica R,K,H,A
 <220>
 20 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 <223> X indica R,K,H,A
 <400> 89
 Lys Lys Ala Phe Leu Ile Tyr Xaa Phe Tyr Phe Xaa Leu Ile
 1 5 10
 25 <210> 90
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 30 <223> péptido sintético
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (13)..(13)
 <223> X indica S o A
 35 <400> 90
 Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile Leu Ile Ala Gly Xaa Ser Lys Lys
 1 5 10 15
 <210> 91
 <211> 22
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 91
 Lys Lys Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 1 5 10 15
 Gly Ala Thr Met Lys Lys
 20

<210> 92
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 92
 Lys Lys Leu Leu Ala Val Ala Ile Gly Ala Ala Met Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15
 Val Ala Gly Lys Lys
 20
 10 <210> 93
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (11)..(11)
 <223> X indica C, S o A
 <400> 93
 Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Xaa Leu Tyr Asp Leu Pro
 1 5 10 15
 20 Trp Lys Lys
 <210> 94
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> péptido sintético
 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (14)..(14)
 30 <223> X indica D, E o A
 <400> 94
 Lys Lys Leu Ala Val Thr Gly Ala Phe Leu Cys Leu Tyr Xaa Leu Pro
 1 5 10 15
 Trp Lys Lys
 <210> 95
 <211> 14
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> péptido sintético
 <400> 95
 Lys Lys Ala Phe Leu Ile Tyr His Phe Tyr Phe His Leu Ile
 40 1 5 10
 <210> 96
 <211> 21

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 5 <400> 96
 Lys Lys Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala
 1 5 10 15

 Val Thr Gly Lys Lys
 20

 <210> 97
 <211> 20
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 97
 Lys Leu Leu Thr Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val
 1 5 10 15
 15 Thr Gly Lys Lys
 20

 <210> 98
 <211> 25
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 98
 Lys Lys Thr Ile Ile Gly Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser
 1 5 10 15

 Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Lys
 20 25
 25 <210> 99
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 30 <223> péptido sintético

 <400> 99
 Lys Lys Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val
 1 5 10 15

 Leu Val Tyr Lys Lys
 20

 <210> 100
 <211> 24
 35 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 100

Lys Lys Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe
1 5 10 15

Tyr Phe His Leu Met Leu Lys Lys
20

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 101

Lys Lys Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp Leu Pro
1 5 10 15

Trp Tyr Lys Lys
20

10 <210> 102

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> péptido sintético

<400> 102

Lys Lys Leu Ile Val Thr Ile Gly Ala Thr Met Leu Val Leu Ala Val
1 5 10 15

Thr Val Thr Lys Lys
20

<210> 103

<211> 21

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<220>

25 <221> característica_misc

<222> (4)..(4)

<223> X is S o A

<220>

<221> característica_misc

30 <222> (7)..(7)

<223> X is S o A

<220>

<221> característica_misc

<222> (12)..(12)

35 <223> X is S o A

<400> 103

Lys Lys Val Xaa Val Leu Xaa Val Leu Val Val Xaa Val Val Ala Val
1 5 10 15

Leu Val Tyr Lys Lys
20

<210> 104

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 5 <223> péptido sintético

 <400> 104
 Lys Lys Val Ser Val Leu Ser Val Leu Val Val Ser Val Val Ala Val
 1 5 10 15

 Leu Val Ala Lys Lys
 20

 <210> 105
 <211> 22
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 105
 Lys Lys Val Val Ala Val Val Ala Val Leu Val Tyr Lys Phe Tyr Phe
 1 5 10 15

 His Leu Met Leu Lys Lys
 15 20

 <210> 106
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 20 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (12)..(12)
 25 <223> X representa Y o A

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (15)..(15)
 <223> X representa Y o A

 30 <400> 106
 Lys Lys Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Xaa Lys Phe Xaa Phe
 1 5 10 15

 His Leu Met Leu Lys Lys
 20

 <210> 107
 <211> 22
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 40 <222> (13)..(13)
 <223> X representa H, K, R o A

<220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (17)..(17)
 <223> X representa H, K, R o A

5 <400> 107
 Lys Lys Val Val Ser Val Val Ala Val Leu Val Tyr Xaa Phe Tyr Phe
 1 5 10 15

 Xaa Leu Met Leu Lys Lys
 20

 <210> 108
 <211> 22
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 108
 Lys Lys Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 1 5 10 15

 Gly Ala Thr Met Lys Lys
 20

15 <210> 109
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 20 <223> péptido sintético

 <400> 109
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

 Leu Pro Trp Tyr Lys Lys
 20

25 <210> 110
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 110
 Lys Lys Ser Glu Leu Ser Ala Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 1 5 10 15

 Gly Ala Thr Met Lys Lys
 20

30 <210> 111
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC

<222> (3)..(3)
 <223> X representa S o A

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 5 <222> (6)..(6)
 <223> X representa S o A

 <400> 111
 Lys Lys Xaa Glu Leu Xaa Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 1 5 10 15

 Gly Ala Thr Met Leu Val Lys Lys
 20

 <210> 112
 10 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 15 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (4)..(4)
 <223> X representa D o E o A

 <400> 112
 Lys Lys Ser Xaa Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 20 1 5 10 15

 Gly Ala Thr Met Lys Lys
 20

 <210> 113
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 30 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (10)..(10)
 <223> X representa T o A

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 35 <222> (15)..(15)
 <223> X representa T o A

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (19) .. (19)
 40 <223> X representa T o A

 <400> 113
 Lys Lys Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Xaa Leu Leu Ile Val Xaa Ile
 1 5 10 15

 Gly Ala Xaa Met Lys Lys
 20

 <210> 114
 <211> 22
 45 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 114
 Lys Lys Ser Glu Leu Ser Cys Asn Ile Thr Leu Leu Ile Val Thr Ile
 1 5 10 15

5 Gly Ala Thr Ala Lys Lys
 20

<210> 115
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

10 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 115
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Ala Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Pro Trp Tyr Lys Lys
 20

15 <210> 116
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

20 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (16)..(16)
 <223> X representa A o D o E

<400> 116
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Xaa
 1 5 10 15

25 Leu Pro Trp Tyr Lys Lys
 20

<210> 117
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> péptido sintético

<400> 117
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

Leu Ala Trp Tyr Lys Lys
 20

35 <210> 118
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> péptido sintético

 <400> 118
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ala Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15
 5 Leu Pro Trp Tyr Lys Lys
 20

 <210> 119
 <211> 22
 <212> PRT
 10 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 15 <222> (7)..(7)
 <223> X representa A o T

 <220>
 <221> CARACTERÍSTICA_MISC
 <222> (9) .. (9)
 20 <223> X representa A o T

 <400> 119
 Lys Lys Val Leu Ala Val Xaa Val Xaa Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

 Leu Pro Trp Tyr Lys Lys
 20

 <210> 120
 <211> 22
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 120
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

 Leu Pro Ala Tyr Lys Lys
 20
 30

 <210> 121
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

 35 <220>
 <223> péptido sintético

 <400> 121
 Lys Lys Val Leu Ala Val Thr Val Thr Ser Leu Cys Ile Tyr Leu Asp
 1 5 10 15

 Leu Pro Trp Ala Lys Lys
 20
 40

 <210> 122
 <211> 14
 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> péptido sintético

<400> 122

Lys Lys Ser Val Ile Val Val Ser Thr Val Ala Phe Leu Ile

5 1 5 10

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> péptido sintético

<400> 123

Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val

1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 75-90, 92-94, 96-120 y 121, en donde el péptido sintético inhibe la activación celular mediada por un receptor Tipo Toll (TLR), para uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR seleccionada del grupo que consiste en una inflamación, enfermedad inflamatoria intestinal, infección, enfermedad autoinmune, enfermedad pulmonar, insuficiencia cardíaca, enfermedad degenerativa, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad reumatoidea, lesión por reperfusión isquémica, enfermedad fibrótica, caquexia, rechazo de injertos, daño por irradiación, asma y cáncer.
2. Un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17-73 y 74, estando unida la secuencia de aminoácidos en sus extremos N- y/o C- a uno o más restos de aminoácidos adicionales cargados positivamente, en donde dicho péptido sintético inhibe la activación celular mediada por un receptor Tipo Toll (TLR), para su uso en el tratamiento de una enfermedad mediada por TLR seleccionada del grupo que consiste en una inflamación, enfermedad inflamatoria del intestino, infección, enfermedad autoinmune, enfermedad pulmonar, insuficiencia cardíaca, enfermedad degenerativa, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad reumatoide, lesión por reperfusión isquémica, enfermedad fibrótica, caquexia, rechazo de injertos, daño por radiación, asma y cáncer.
3. El péptido sintético para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho aminoácido cargado positivamente es lisina, arginina, histidina u ornitina.
4. El péptido sintético para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enfermedad mediada por TLR se selecciona del grupo que consiste en un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS), choque séptico, sepsis, choque endotóxico, choque hemodinámico, neuritis óptica, síndrome de sepsis, lesión por reperfusión post-isquémica, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, infección por VIH, citomegalovirus, herpes simple, virus de la gripe, malaria, hepatitis crónica, candidiasis, infección micobacteriana, meningitis, insuficiencia cardíaca congestiva, esclerosis múltiple, psoriasis, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, predisposición a infección bacteriana pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva con edema pulmonar, artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis, aterosclerosis, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, carcinoma gástrico, cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario epitelial, carcinomas de células escamosas cervicales, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, melanoma y neuroblastoma.
5. El péptido sintético para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha enfermedad mediada por TLR es una inflamación aguda tal como un choque séptico o un cáncer, tal como un cáncer de próstata.
6. Un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 75-90, 92-94, 96-120 y 121, en donde el péptido sintético inhibe la activación celular mediada por dicho Receptor Tipo Toll (TLR).
7. Un péptido sintético de como máximo 30 restos de aminoácidos que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17-73 y 74, estando unida la secuencia de aminoácidos en sus extremos N y/o C a uno o más restos de aminoácidos cargados positivamente, en donde dicho péptido sintético inhibe la activación celular mediada por dicho TLR.
8. El péptido sintético según la reivindicación 7, en el que dicho aminoácido cargado positivamente es lisina, arginina, histidina u ornitina.
9. El péptido sintético de acuerdo con la reivindicación 7, en el que uno o dos restos de lisina se añaden a uno o a ambos extremos N- o C-.
10. Una composición farmacéutica que comprende un péptido sintético de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Fig. 1A

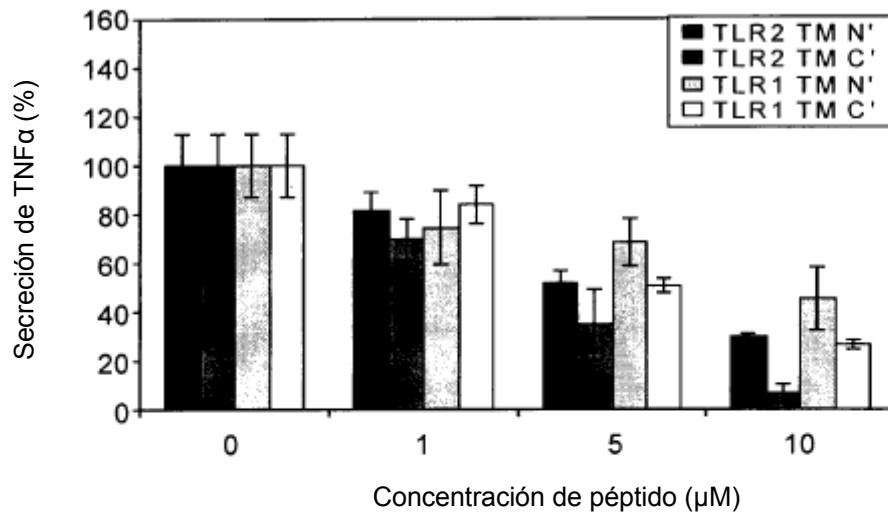


Fig. 1B

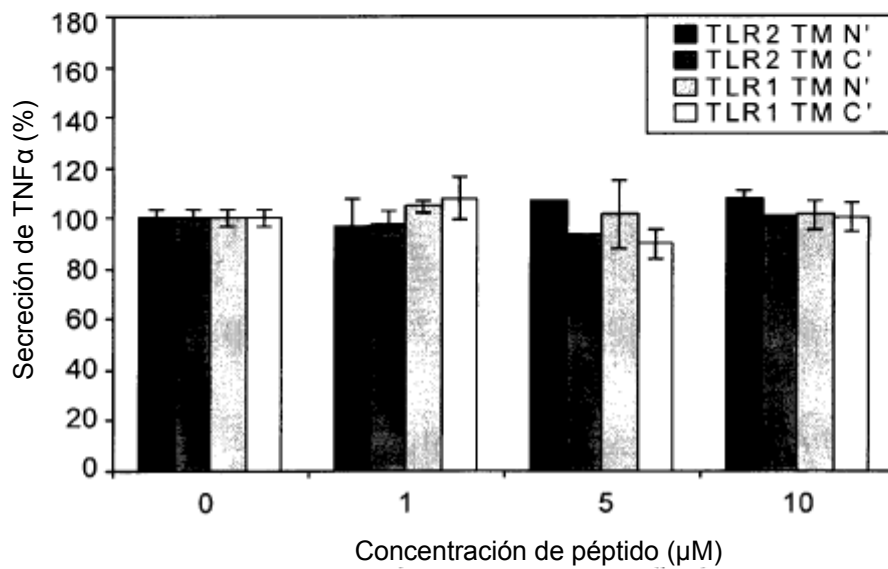


Fig. 1C

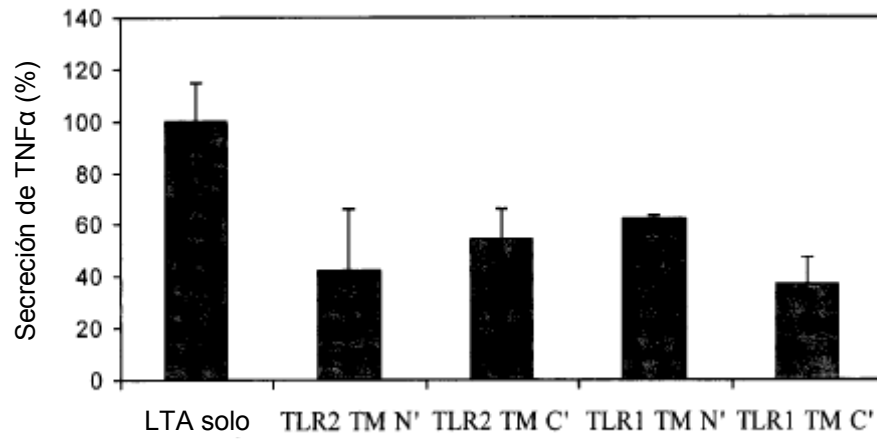


Fig. 1D

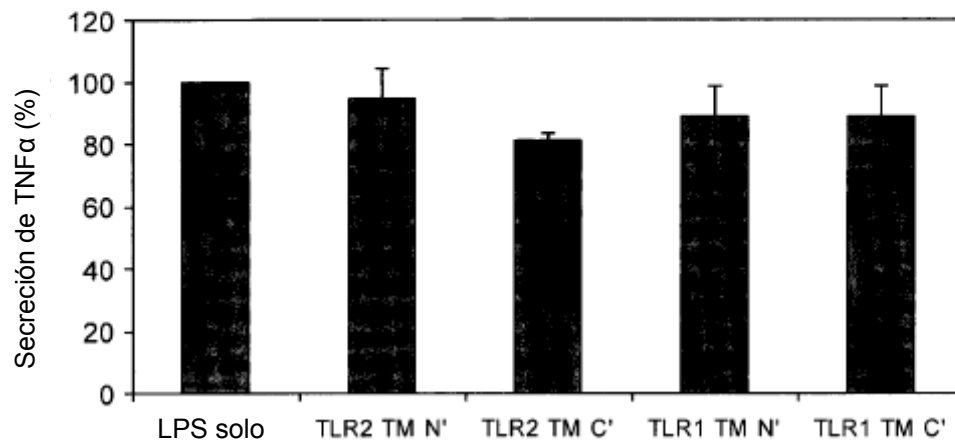


Fig. 2A

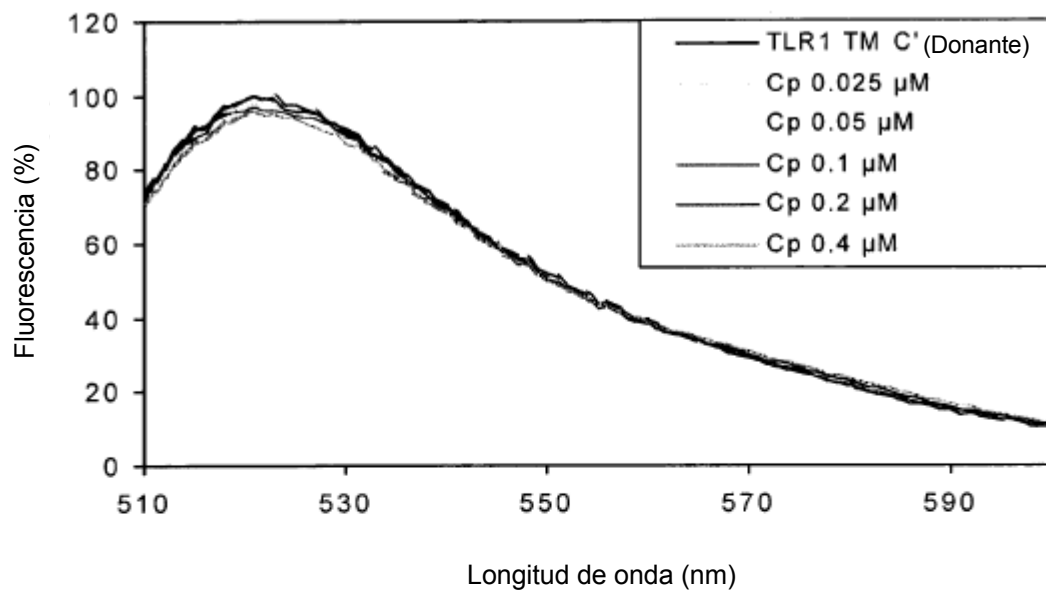


Fig. 2B

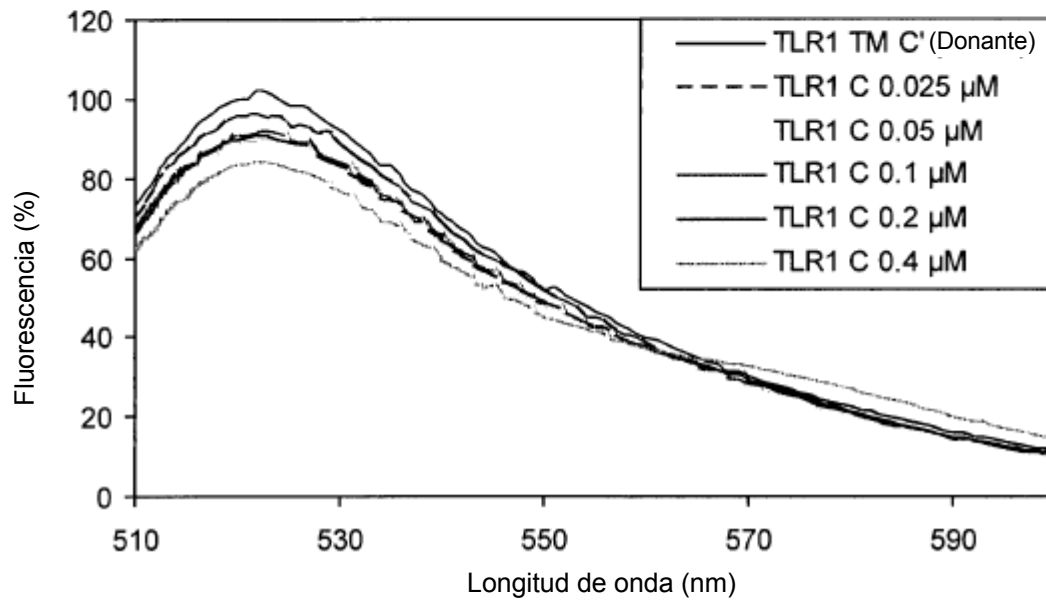


Fig. 2C

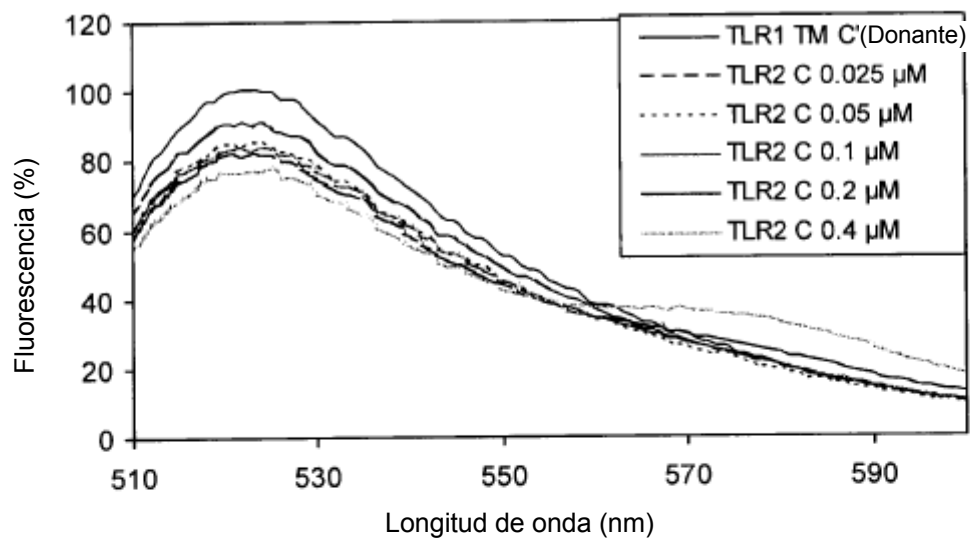


Fig. 3A

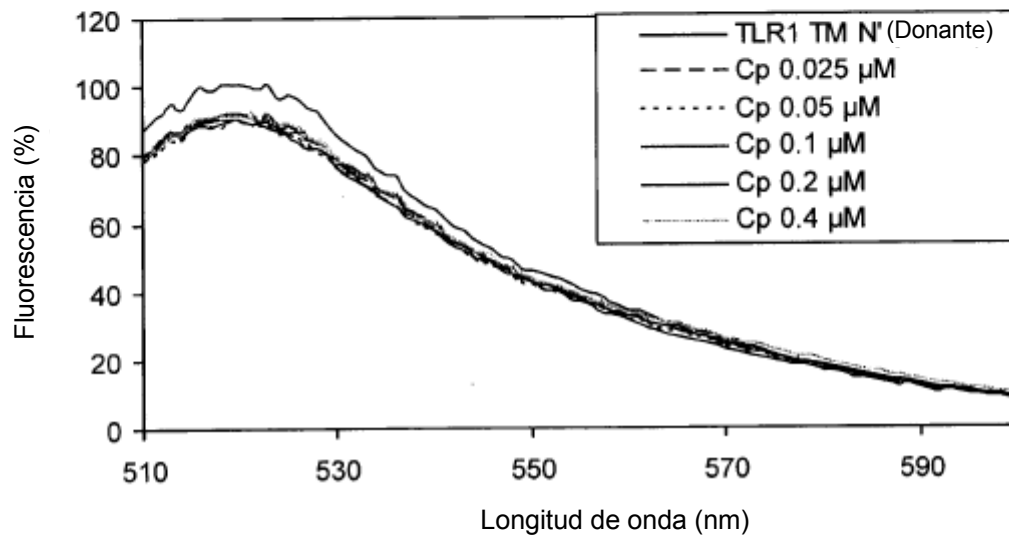


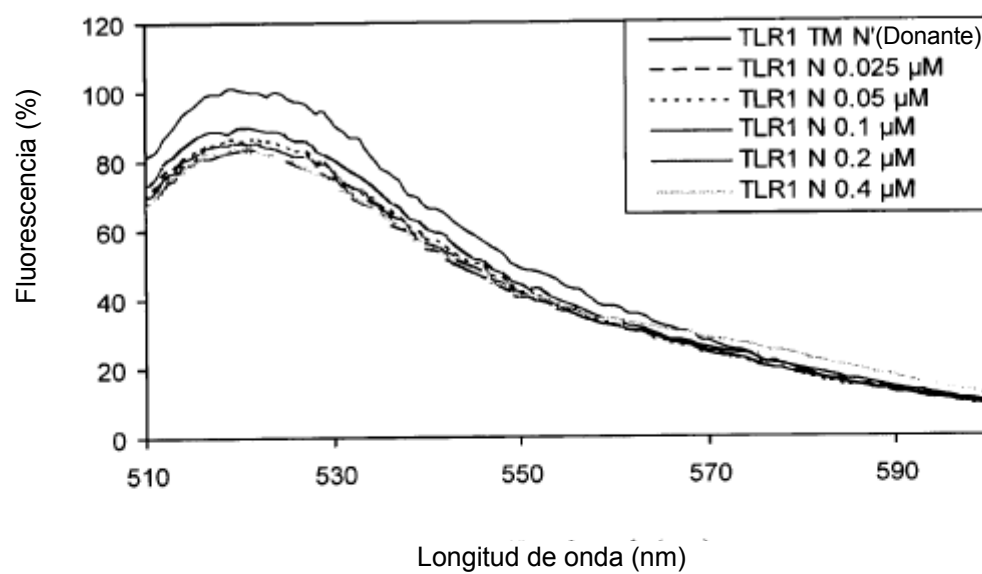
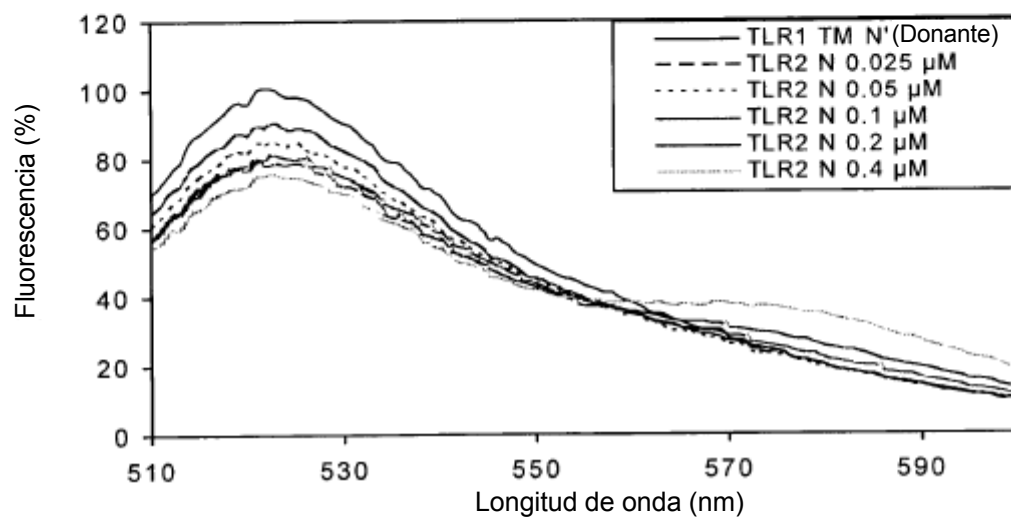
Fig. 3B**Fig. 3C**

Fig. 4A

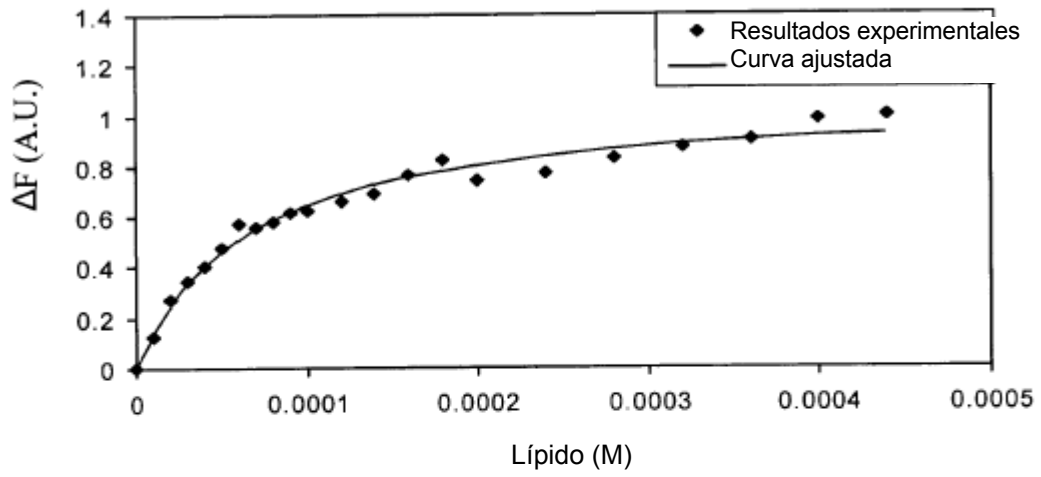


Fig. 4B

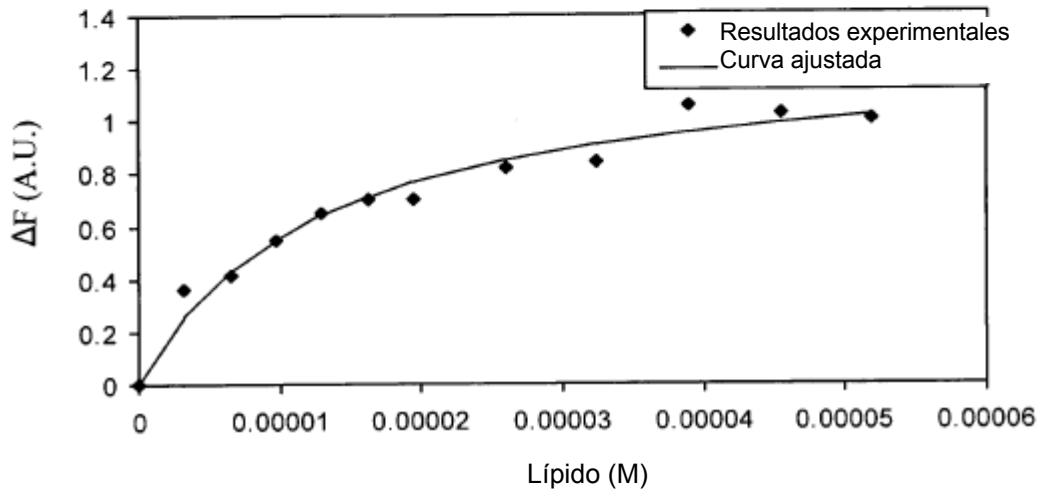


Fig. 5A

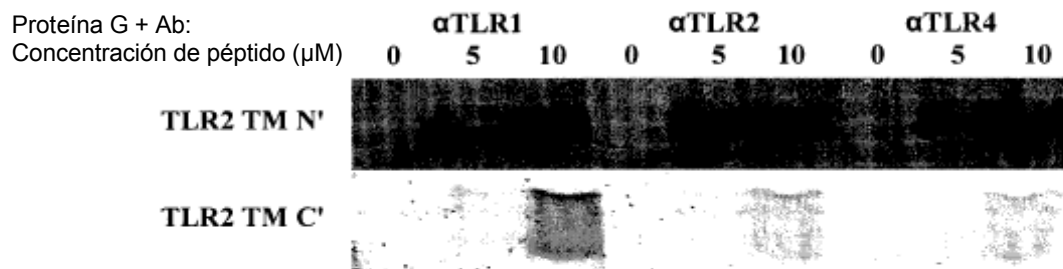


Fig. 5B

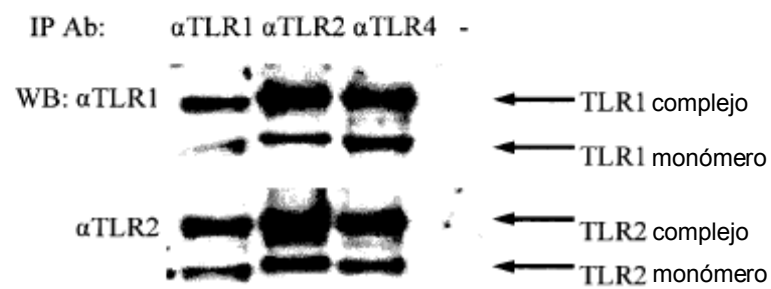


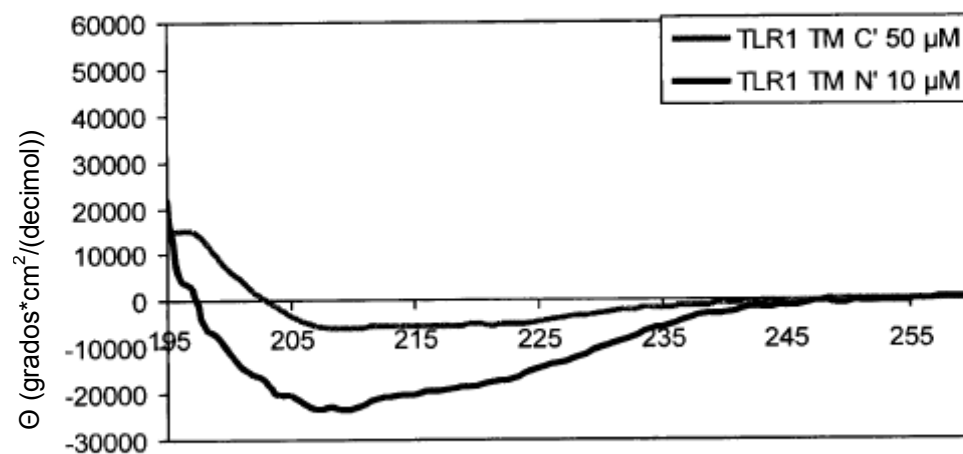
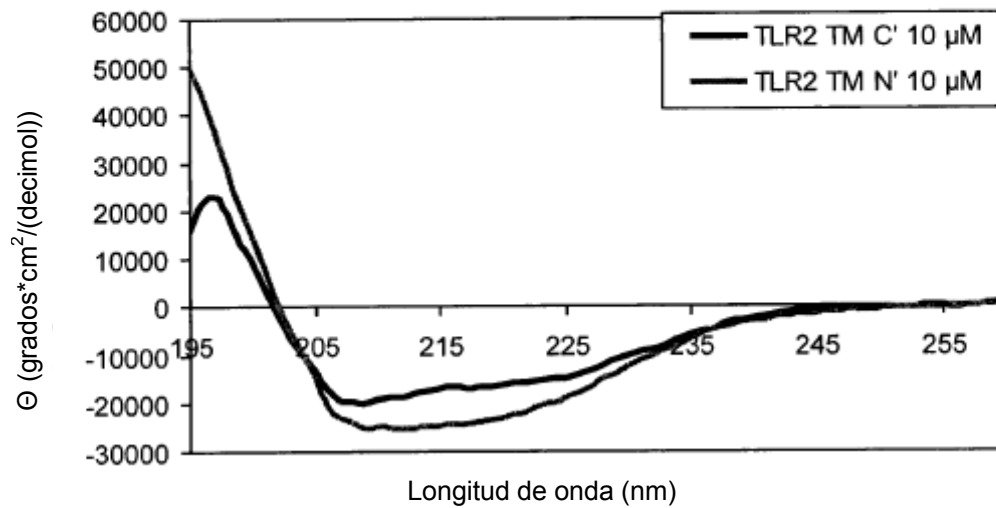
Fig. 6A**Fig. 6B**

Fig. 7A

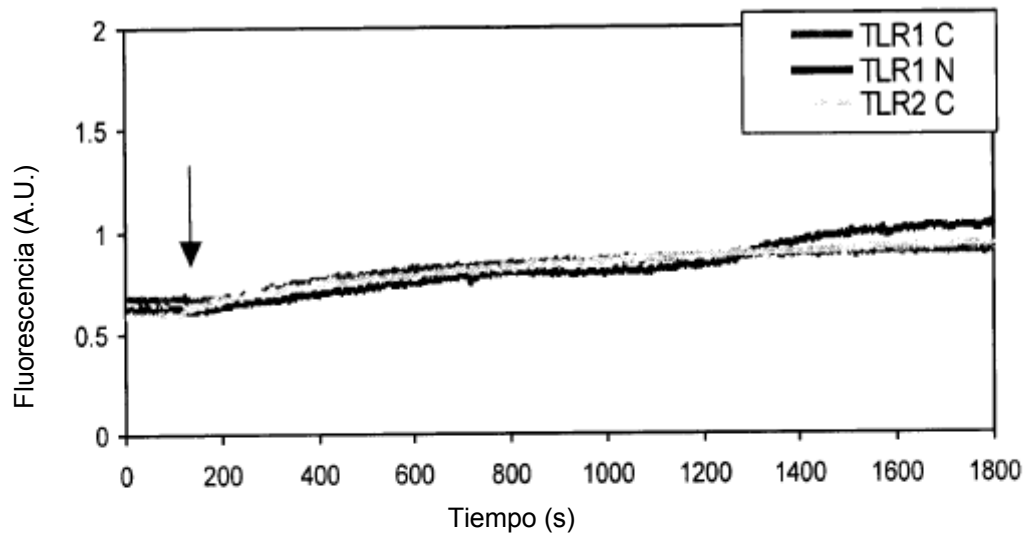


Fig. 7B

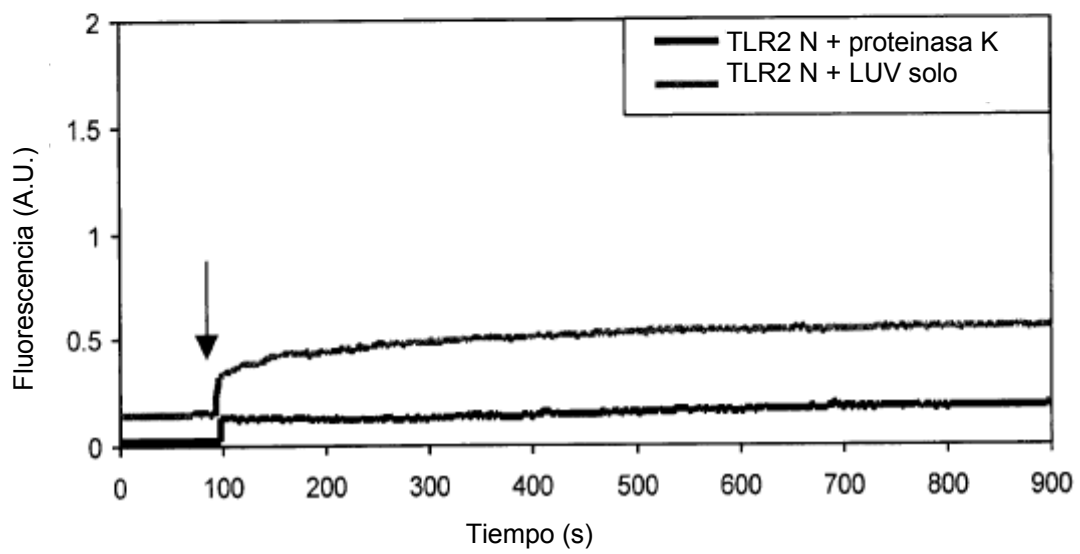


Fig. 7C

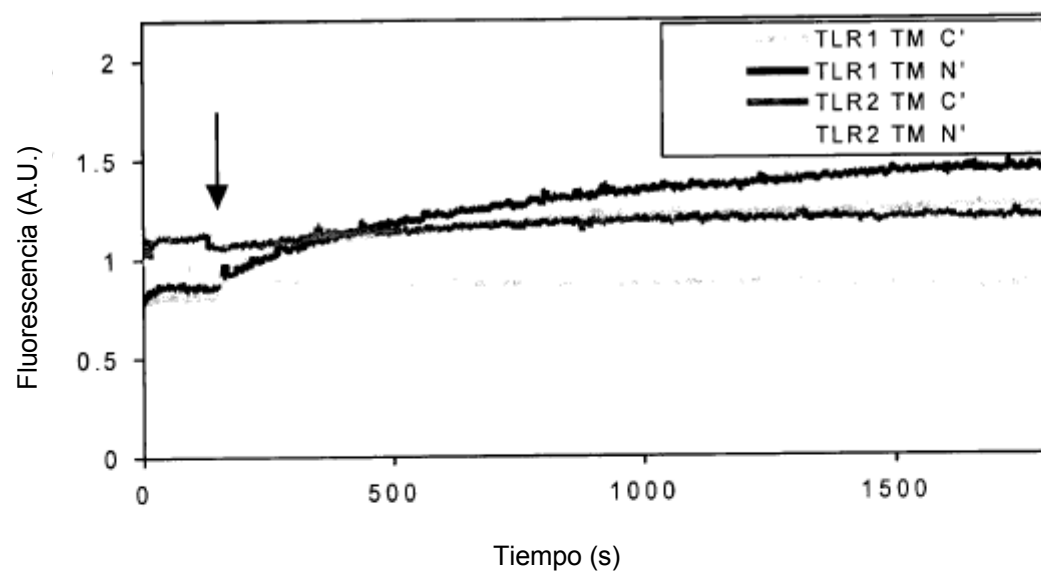


Fig. 7D

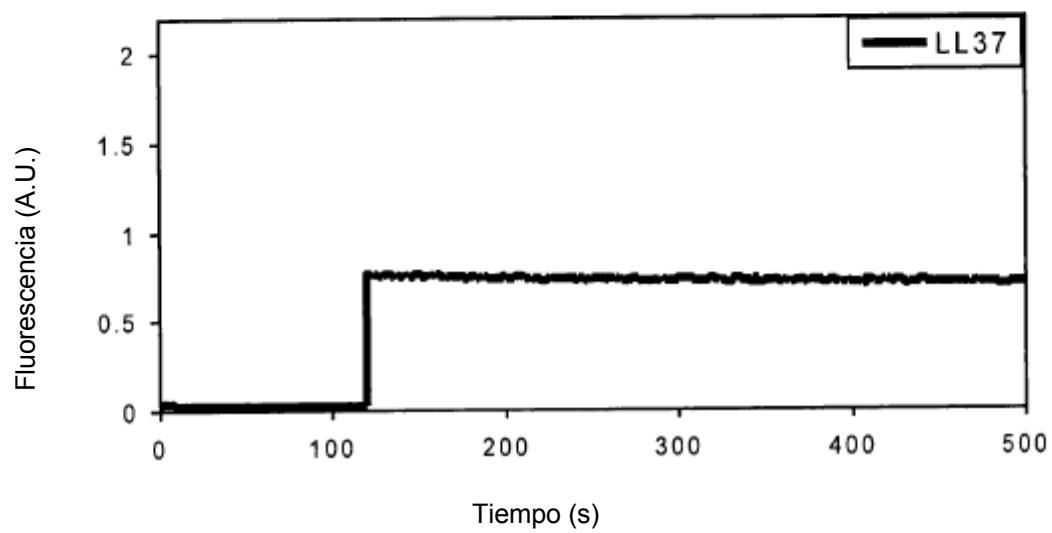


Fig. 8

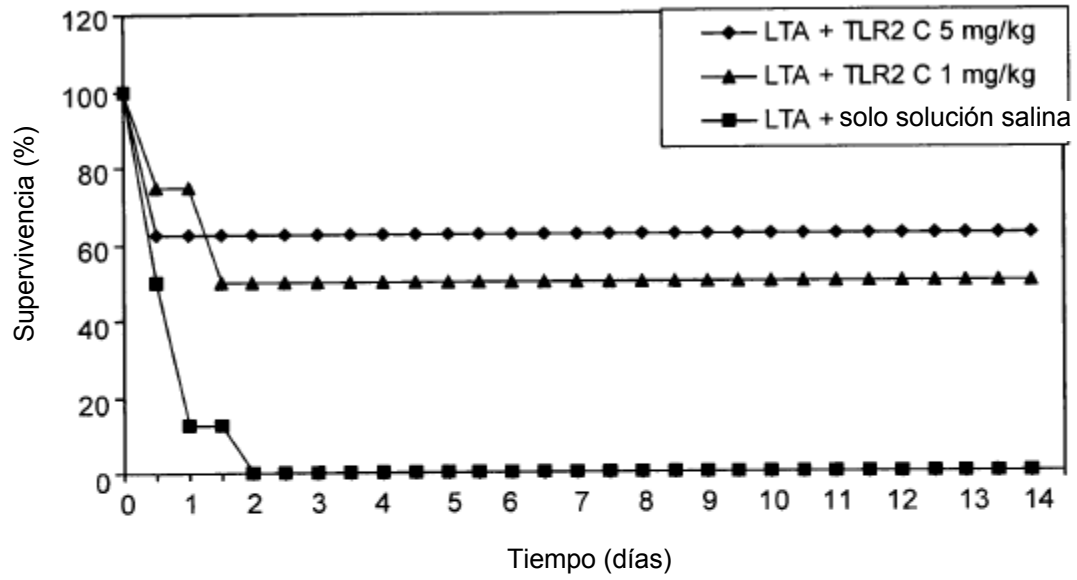


Fig. 9

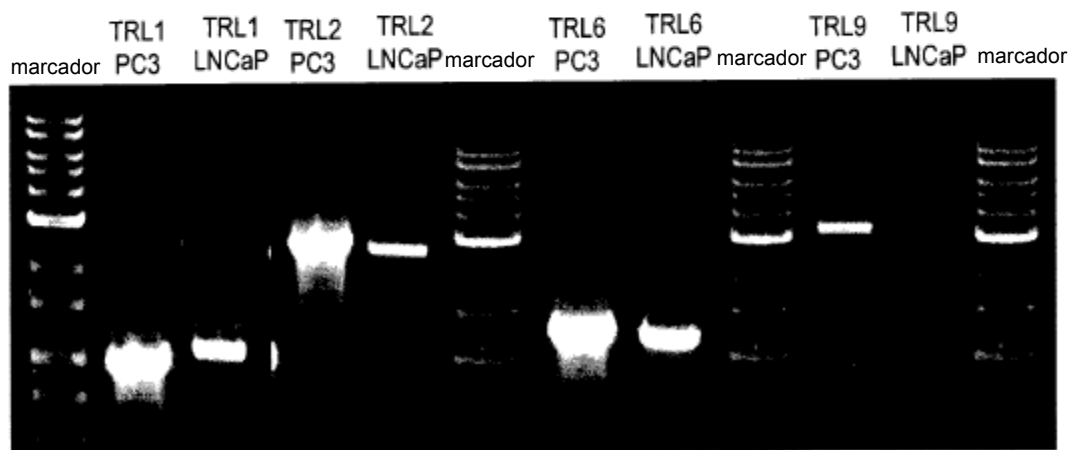


Fig. 10

Número de cambios en la expresión de luc
(normalizado con PBS)

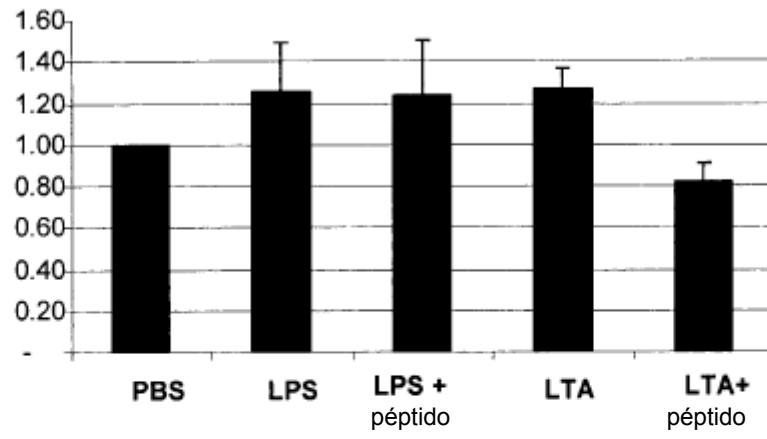


Fig. 11

Ensayo de proliferación de XTT

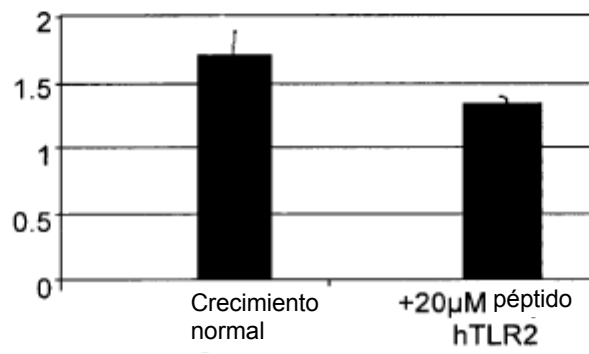


Fig. 12A

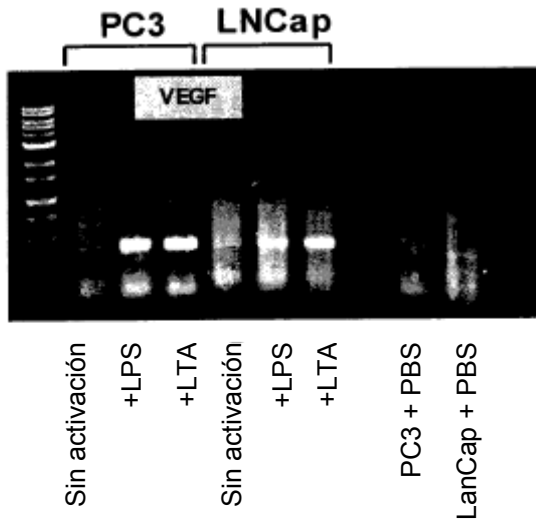


Fig. 12B

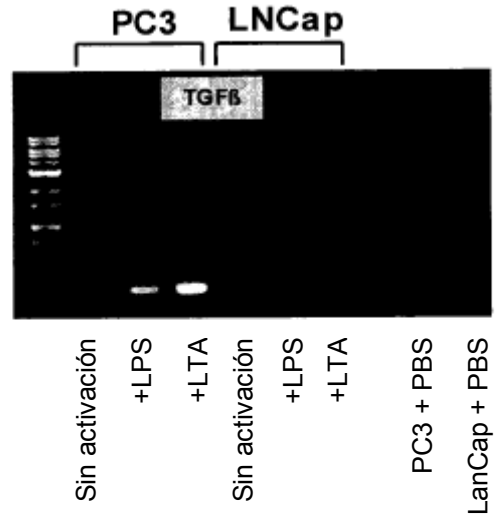


Fig. 13A

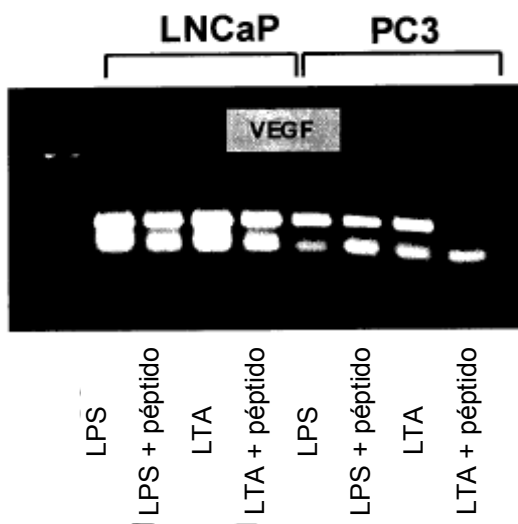


Fig. 13B

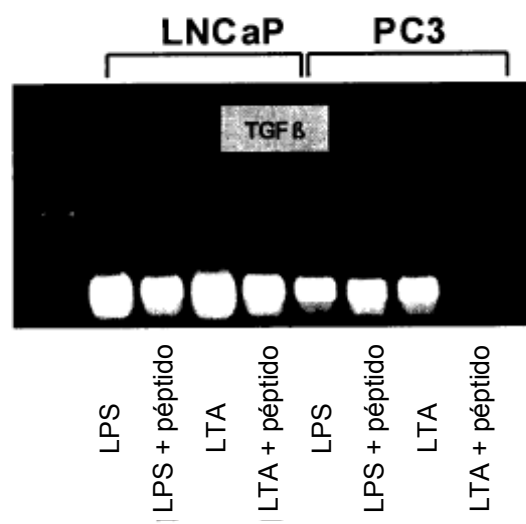


Fig. 14

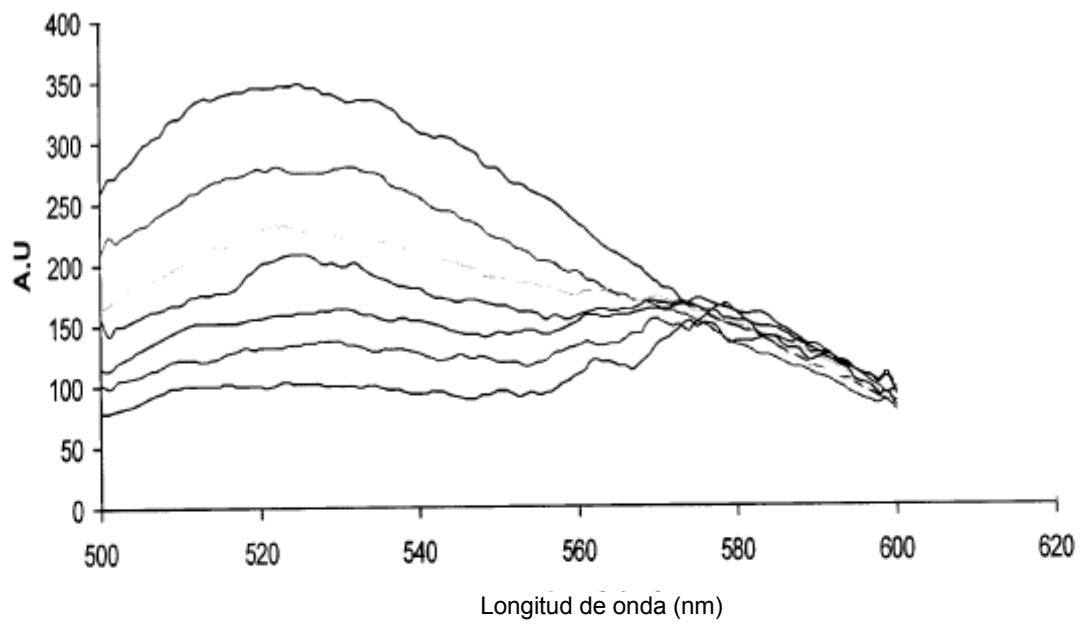


Fig. 15

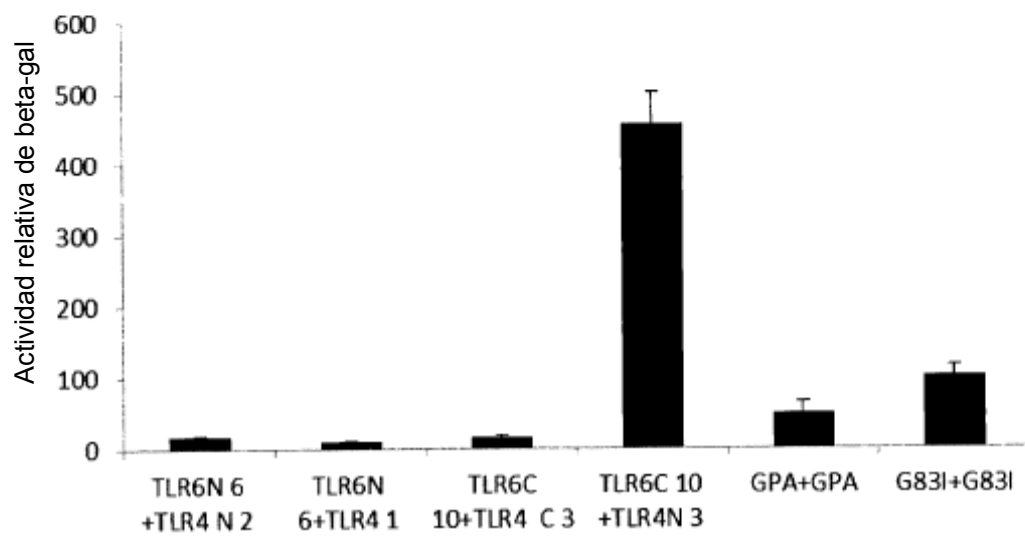


Fig. 16

