

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 663 379**

51 Int. Cl.:

A61K 38/04 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

C07K 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.03.2008 PCT/GB2008/001020**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2008 WO08114037**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2008 E 08718857 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.11.2017 EP 2131852**

54 Título: **Tratamiento de inflamación y/o shock endotóxico**

30 Prioridad:

22.03.2007 GB 0705488

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

12.04.2018

73 Titular/es:

**OXFORD UNIVERSITY INNOVATION LIMITED
(100.0%)**

**Buxton Court, 3 West Way
Botley, Oxford OX2 0JB, GB**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 663 379 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

Tratamiento de inflamación y/o shock endotóxico

5 La presente invención se refiere al tratamiento de inflamación y/o shock endotóxico y/o a la reducción de niveles de quimioquinas inflamatorias, y a composiciones para uso en el tratamiento de inflamación y/o shock endotóxico, o para la reducción de los niveles de mediadores inflamatorios.

10 La inflamación es un componente de la patogénesis de muchas enfermedades humanas y animales, que también surge como resultado de daño físico, químico o traumático a tejidos en un cuerpo humano o animal. En general, la respuesta inmune da como resultado la liberación sistémica de mediadores químicos endógenos que producen vasodilatación, migración de neutrófilos, quimiotaxis, y aumento de la permeabilidad vascular. La respuesta inmune es esencialmente la misma en cualquier sitio que se produzca y sea cual sea su causa. La respuesta puede ser aguda (efímera) o puede ser crónica (larga duración).

15 El shock endotóxico, en ocasiones también denominado shock séptico, se cree que se produce debido a la exposición intravascular a grandes cantidades de endotoxina dando como resultado una respuesta similar a una inflamación. La exposición a endotoxinas da como resultado la producción de un número de citoquinas, incluyendo TNF α e IL-1. El sistema de complementos y la cascada de coagulación, incluyendo el Factor VII también se estimulan. El resultado de esta reacción puede ser daño tisular, fiebre, vasodilatación, taquicardia y coagulación intravascular.

25 Generalmente una respuesta inflamatoria es beneficiosa, proporcionando al sitio de inflamación un mayor acceso a nutrientes, oxígeno, anticuerpos y fármacos terapéuticos, así como también una mayor formación de fibrina y dilución de toxinas. Sin embargo, si inflamación no es deseada o es prolongada entonces puede dañar el tejido. En situaciones de este tipo, a menudo se usan fármacos antiinflamatorios. Existen dos tipos principales de fármacos antiinflamatorios, corticosteroides y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (los AINE).

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

40 La quemerina es una proteína abundante presente en una diversidad de exudados inflamatorios humanos incluyendo el líquido ascítico y sinovial (Wittamer V *et al.* J Exp Med. 6 de Oct de 2003; 198 (7): 977-985; Meder Wet *et al.* FEBS Lett. 18 de Dec de 2003; 555 (3): 495-499). La quemerina humana es secretada como un precursor de 163 aminoácidos (aa) denominado ProQuemerina (el equivalente murino de *Mus musculus*, tiene 162 aa) que experimenta un truncamiento en los extremos N- y C-terminales para generar una proteína quimiotáctica de 137 aa (140 aa en *Mus musculus*) (Wittamer V *et al.* J Exp Med. 6 de Oct de 2003; 198 (7): 977-985; Zabel BA *et al.* J Biol Chem. 14 de Oct de 2005; 280 (41): 34661-34666; Wittamer V *et al.* J Immunol. 1 de Jul de 2005; 175 (1): 487-493; Samson M *et al.* Eur J Immunol. Mayo de 1998; 28 (5): 1689-1700). La estructura predicha para la Quemerina indica similitudes estructurales con las quimioquinas y se ha descrito como una quimioquina "inversa", que posee potencialmente un extremo de carboxilo desordenado, una lámina plegada en α y un dominio amino-terminal β -helicoidal (Zabel BA *et al.* Exp Hematol. Agosto de 2006; 34 (8):1021-1032). La estructura recuerda al plegamiento de la cistatina presente en catelicidinas y kininógenos que también experimentan procesamiento proteolítico para conseguir activación (Zabel BA *et al.* Exp Hematol. Agosto de 2006; 34 (8): 1106-1114; Colman RW, Biol Chem. Enero de 2001; 382 (1): 65-70; Yamasaki K *et al.* FASEB J. 1 de Octubre, 2006 2006; 20 (12): 2068-2080).

55 Wittamer *et al.* (J. Biol. Chem. (2004) 279 (11) 9956 - 9962) describe experimentos para demostrar péptidos del extremo C-terminal de la quemerina con un efecto agonista sobre el receptor Quem R23. Los estudios de supresión confirmaron la importancia del procesamiento del extremo C-terminal de la proquemerina e identificaron un nonapéptido con fuerte actividad agonista.

60 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención proporciona el uso de uno o más péptidos como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de inflamación, y/o el tratamiento de una herida, y/o el tratamiento de shock endotóxico.

65 En algunas realizaciones, la invención proporciona el uso de uno o más péptidos como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento que reduce el nivel de uno o más mediadores inflamatorios.

De acuerdo con otro aspecto adicional, la presente invención proporciona uno o más péptidos como se define en la reivindicación 1, para uso en el tratamiento de inflamación, y/o en el tratamiento de shock endotóxico, y/o el tratamiento de una herida.

5 En algunas realizaciones el uno o más péptidos de la reivindicación 1 reducen el nivel de uno o más mediadores inflamatorios.

10 El uno o más mediadores inflamatorios pueden incluir citoquinas, quimioquinas y lípidos que median la inflamación. El mediador inflamatorio puede incluir una o más quimioquinas seleccionadas entre el grupo que comprende TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-2 (CCL8), GRO α (CXCL1), GRO β (CXCL2), IL-8 (CXCL8), TECK (CCL25), MCP-1 (CCL2), interferón γ y RANTES (CCL5). Preferentemente, el medicamento puede reducir los niveles de TNF α .

15 De manera sorprendente, los péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de la proteína Quemerina tienen propiedades antiinflamatorias, y se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar la inflamación y/o el shock endotóxico.

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

20 Preferentemente, el péptido tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 aminoácidos. Más preferentemente, el péptido tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 aminoácidos, preferentemente, el péptido tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos.

25 Preferentemente, el péptido comprende entre aproximadamente 5 y aproximadamente 30 aminoácidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o un análogo o un derivado de la misma. Más preferentemente, el péptido tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 25 aminoácidos, preferentemente, el péptido tiene entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 aminoácidos.

30 La referencia a una proteína Quemerina se refiere a la forma procesada de la Quemerina, en la que los aminoácidos N-terminales encontrados en la PreProQuemerina se han retirado de forma proteolítica, y los aminoácidos C-terminales encontrados en el precursor de ProQuemerina se han retirado de forma proteolítica para producir la forma troncada activa de la proteína denominada Quemerina.

35 Preferentemente el péptido se obtiene a partir de una forma de Quemerina humana o no humana. Preferentemente el péptido se obtiene a partir de una forma de Quemerina humana o de mamífero. La Quemerina no humana de mamíferos se puede obtener a partir de un roedor, tal como una rata o un ratón, un caballo, un perro, un gato, una vaca, una oveja o un cerdo.

40 El péptido obtenido a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina tiene una identidad de al menos un 80 % o superior con el extremo C-terminal de origen natural de la proteína Quemerina.

45 Preferentemente el péptido tiene una identidad secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, 90 % o superior con entre aproximadamente los últimos 5 y aproximadamente los últimos 30, preferentemente entre aproximadamente los últimos 10 y aproximadamente los últimos 25, aminoácidos que se producen de forma natural en el extremo C-terminal de una proteína Quemerina.

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

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

55 La secuencia de longitud completa de una Quemerina, ProQuemerina y PreProQuemerina humana y murina se proporciona en la Figura 2A, y se refleja en las Seq ID nos: 31, 32, 33, respectivamente para las proteínas humanas, y En las Seq ID nos: 34, 35, 36, respectivamente para las proteínas de ratón. Preferentemente el péptido de Quemerina tiene la secuencia de la Seq ID No: 31 o 34. La secuencia de las proteínas Quemerina de otras especies, tal como bovina y rata, están fácilmente disponibles en GenBank y los expertos en la materia pueden acceder a ellas fácilmente.

60 Preferentemente el péptido tiene una identidad secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, 90 % o superior con entre los últimos 5 y los últimos 30 aminoácidos de la Quemerina de acuerdo con la Seq ID no: 31 (secuencia humana) y Seq ID no: 34 (secuencia de ratón).

65 El porcentaje de identidad de la secuencia de aminoácidos se define como el porcentaje de restos de aminoácido en una secuencia que son idénticos a los aminoácidos en la proteína Quemerina de origen natural después de

alineamiento de las secuencias e introducción de huecos si fuera necesario para conseguir el porcentaje máximo de identidad de secuencia. El alineamiento, para fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia, se puede conseguir de muchas formas que son bien conocidas para la persona con experiencia en la materia, e incluyen, por ejemplo, el uso de algoritmos BLAST y ALIGN.

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

15 Los términos "análogo" o "derivado" se refiere a péptidos que tienen una secuencia diferente a la secuencia de origen natural pero que comprenden esencialmente los mismos o más de, y al menos aproximadamente un 50 %, preferentemente aproximadamente un 60 %>, 70 %>, 80 %> o un 90 %, la actividad antiinflamatoria, y/o la actividad anti-shock endotóxico, actividad reductora del mediador inflamatorio, observadas con un péptido que tiene una secuencia de origen natural.

20 Un análogo derivado de péptido puede tener una o más deleciones, inserciones, o modificaciones de cualquier resto de aminoácido, incluyendo el resto N o C-terminal. El péptido puede estar acetilado, acilado, alquilado, glicosilado, y similares. El péptido también puede comprender aminoácidos adicionales ya sea en el extremo C o N terminal, o en ambos extremos.

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

25 El péptido puede incluir una o más sustituciones de aminoácido conservativas en comparación con la secuencia de aminoácidos de origen natural.

Preferentemente uno o más de los péptidos para uso o usados en la preparación de un medicamento comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende:

30 PHGYFLPGQFA (Quemerina1 1-ratón; C11m; Seq ID No: 1);
 PHGYFLPGQFAF (Quemerina12-ratón; C12m; Seq ID No: 2);
 PHGYFLPGQFAFS (Quemerina13-ratón; C13m; Seq ID No: 3);
 AGEDPHGYFLPGQFA (Quemerina15-ratón; C15m; Seq ID No: 4);
 AGEDPHGYFLPGQFAF (Quemerina16-ratón; C16m; Seq ID No: 5);
 35 AGEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina17-ratón; C17m; Seq ID No: 6);
 DPHGYFLPGQFA (Quemerina12A-ratón; C12Am; Seq ID No: 7);
 EDPHGYFLPGQFA (Quemerina13A-ratón; C13Am; Seq ID No: 8);
 GEDPHGYFLPGQFA (Quemerina14A-ratón; C14Am; Seq ID No: 9);
 DPHGYFLPGQFAF (Quemerina13B-ratón; C13Bm; Seq ID No: 10);
 40 EDPHGYFLPGQFAF (Quemerina14B-ratón; C14Bm; Seq ID No: 11);
 GEDPHGYFLPGQFAF (Quemerina15A-ratón; C15Am; Seq ID No: 12);
 DPHGYFLPGQFAFS (Quemerina14C-ratón; C14Cm; Seq ID No: 13);
 EDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina15B-ratón; C15Bm; Seq ID No: 14);
 GEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina16A-ratón; C16Am; Seq ID No: 15);
 45 PHSFYFPGQFA (Quemerina11-humana; C11h; Seq ID No: 16);
 PHSFYFPGQFAF (Quemerina12- humana; C12h; Seq ID No: 17);
 PHSFYFPGQFAFS (Quemerina13-humana; C13h; Seq ID No: 18);
 AGEDPHSFYFPGQFA (Quemerina15-humana; C15h; Seq ID No: 19);
 AGEDPHSFYFPGQFAF (Quemerina16-humana; C16h; Seq ID No: 20);
 50 AGEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina17-humana; C17h; Seq ID No: 21);
 DPHSFYFPGQFA (Quemerina12A-humana; C12Ah; Seq ID No: 22);
 EDPHSFYFPGQFA (Quemerina13A-humana; C13Ah; Seq ID No: 23);
 GEDPHSFYFPGQFA (Quemerina14A-humana; C14Ah; Seq ID No: 24);
 DPHSFYFPGQFAF (Quemerina13B-humana; C13Bh; Seq ID No: 25);
 55 EDPHSFYFPGQFAF (Quemerina14B-humana; C14Bh; Seq ID No: 26);
 GEDPHSFYFPGQFAF (Quemerina15A-humana; C15Ah; Seq ID No: 27);
 DPHSFYFPGQFAFS (Quemerina14C-humana; C14Ch; Seq ID No: 28);
 EDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina15B-humana; C15Bh; Seq ID No: 29); y
 GEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina16A-humana; C16Ah; Seq ID No: 30); o análogos o derivados de los mismos.

60 Preferentemente uno o más de los péptidos comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende: AQAGEDPHGYFLPGQFAFS (Quemerina19-ratón; C19m; Seq ID No: 37); y QRAGEDPHSFYFPGQFAFS (Quemerina19-humana; C19h; Seq ID No: 38); o análogos o derivados de los mismos.

65 Preferentemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, 90 % o superior con uno o más de los péptidos mencionados anteriormente como Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13,

14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

Preferentemente el péptido tiene una identidad secuencia de al menos aproximadamente un 80 %, 90 % o superior con uno o más de los péptidos mencionados anteriormente como Seq ID No: 37 o 38.

5 Preferentemente un análogo o derivado de un péptido obtenido a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina incluye miméticos de molécula pequeña de un péptido.

10 El péptido, análogo o derivado, se puede aislar de un sistema natural, o se puede producir por vía sintética o por vía recombinante. Los péptidos sintetizados se pueden producir mediante métodos químicos convencionales, incluyendo síntesis mediante procedimiento automatizado.

15 Los péptidos recombinantes se pueden usar en una forma purificada. Como alternativa, se puede usar el sobrenadante de las células que expresan el péptido recombinante.

El péptido, análogo o derivado puede formar parte de una proteína o complejo molecular de mayor tamaño.

El péptido puede ser de cadena lineal o cíclico.

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

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

25 El péptido se puede etiquetar, tal como con una etiqueta radiactiva, etiqueta fluorescente, un etiqueta de espectrometría de masas, biotina o similares, mediante métodos conocidos en la técnica.

El medicamento puede comprender otros principios activos, incluyendo otros agentes antiinflamatorios conocidos, y/o otros agentes anti-shock endotóxico, y/o otros agentes conocidos para reducir los niveles de quimioquinas.

30 El medicamento también puede contener un excipiente farmacéuticamente aceptable. El excipiente puede comprender macromoléculas grandes tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácido, trehalosa, agregados de lípido y partículas de virus inactivo. Los excipientes de este tipo serán bien conocidos por las personas con experiencia en la materia.

35 El medicamento también puede comprender uno o más de un agente de tamponamiento, un agente de aumento de la viscosidad, un disolvente, un estabilizante y un conservante.

40 La vía de administración del medicamento puede ser inyección o infusión mediante las vías parenteral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraarterial, intralesional, intraarticular, tópica, oral, rectal, nasal, inhalación o cualquier otra vía adecuada.

45 La dosificación de los péptidos usados dependerá del péptido, la diana y el tratamiento. La determinación de la dosificación y la vía de administración está muy incluida dentro de la experiencia de un médico habitual. Los regímenes de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 1 pg/kg a aproximadamente 100 mg/kg, más preferentemente la dosificación será de aproximadamente 10 pg/kg a aproximadamente 1 mg/kg, más preferentemente de aproximadamente 10 pg/kg a aproximadamente 100 ng/kg. Preferentemente estas dosificaciones son dosis al día.

50 De manera sorprendente se ha encontrado que una dosis tan baja como 0,32 ng/kg de un péptido de acuerdo con la invención tiene eficacia contra la peritonitis estéril en ratones, mientras que se necesitan 1,2 mg/kg de dexametasona para observar un grado de eficacia similar.

55 Preferentemente un medicamento de acuerdo con un uso de la invención puede estar destinado para su administración a una dosis entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 1 mg/kg, más preferentemente a una dosis entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 100 ng/kg, o entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 10 ng/kg. Estas dosis son al menos tres logs menores que la dosis de dexametasona necesaria.

60 La invención permite un método para tratar, prevenir o mejorar la inflamación en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o análogos o derivados de la misma.

La invención permite un método para tratar, prevenir o mejorar el shock endotóxico en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o análogos o derivados de la misma.

65 La invención el millón método para reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios en un sujeto que

comprende administrar al sujeto uno o más péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o análogos o derivados de la misma.

El tratamiento puede ser terapéutico o profiláctico.

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

10 Como alternativa el medicamento de la invención se puede aplicar directamente a un dispositivo médico para reducir el riesgo de inflamación relacionada con el dispositivo. Esto se puede conseguir aplicando el medicamento a la superficie del dispositivo o impregnando la superficie del dispositivo con uno o más péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o análogos o derivados de la misma.

15 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un dispositivo médico impregnado con uno o más péptidos de acuerdo con la reivindicación 9.

20 El dispositivo médico puede ser una endoprótesis vascular o un catéter.

De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona un apósito o vendaje para heridas impregnado con uno o más péptidos de acuerdo con la reivindicación 9.

25 La inflamación a la que se hace mención en cualquier aspecto de la invención puede estar asociada con una afección tal como artritis crónica juvenil, espondiloartropatías, esclerosis sistémica (esclerodermia), miopatías inflamatorias idiopáticas (dermatomiositis, polimiositis), síndrome de Sjogren, vasculitis sistémica, sarcoidosis, anemia hemolítica autoinmune (pancitopenia inmune, hemoglobinuria paroxística nocturna), trombocitopenia autoinmune (púrpura trombocitopénica idiopática, trombocitopenia mediada por el sistema inmune), tiroiditis (enfermedad de Grave, tiroiditis de Hashimoto, tiroiditis linfocítica juvenil, tiroiditis atrófica), enfermedades autoinmunes inflamatorias (por ejemplo, encefalomiелitis alérgica, esclerosis múltiple, diabetes mellitus dependiente de insulina, uveorretinitis autoinmune, tirotoxicosis, esclerodermia, lupus sistémico eritematoso, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enteritis regional, ileítis distal, enteritis granulomatosa, ileítis regional, ileítis terminal), enfermedad tiroidea autoinmune, anemia perniciosa, rechazo a aloinjerto, diabetes mellitus, enfermedad renal mediada por el sistema inmune (glomerulonefritis, nefritis tubulointerstial), enfermedades desmielinizantes del sistema nervioso central y periférico tales como esclerosis múltiple, polineuropatía desmielinizante idiopática o síndrome de Guillain-Barre, y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica, enfermedades hepatobiliares tales como hepatitis infecciosa (hepatitis A, B, C, D, E y otros virus no hepatotrópicos), hepatitis crónica activa autoinmune, cirrosis biliar primaria, hepatitis granulomatosa, colangitis esclerosante, enteropatía sensible al gluten, enfermedad de Whipple, enfermedades de la piel autoinmunes o

30 mediadas por el sistema inmune, incluyendo enfermedades cutáneas bullosas, eritema multiforme y dermatitis por contacto, psoriasis, enfermedades alérgicas tales como asma, rinitis alérgica, dermatitis atópica, hipersensibilidad a alimentos y urticaria, enfermedades inmunológicas del pulmón tales como neumonías eosinofílicas, fibrosis pulmonar idiopática y neumonitis por hipersensibilidad, enfermedades asociadas a trasplante, incluyendo rechazo a injertos y enfermedad de injerto contra hospedador, enfermedades infecciosas incluyendo enfermedades líricas tales como SIDA (infección por VIH), herpes, etc., infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones por protozoos, infecciones parasitarias y virus sincitial respiratorio, virus de la inmunodeficiencia humana, etc., eccema y shock endotóxico.

50 De acuerdo con otro aspecto la invención proporciona una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico, y/o para el tratamiento de una herida, y/o el tratamiento de inflamación, comprendiendo dicha composición farmacéutica uno o más péptidos como se define en la reivindicación 13.

La composición farmacéutica es para el tratamiento y/o prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico, y/o puede reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citoquinas y quimioquinas.

60 También se describen péptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 % con respecto a un péptido que tiene la secuencia de Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30. Preferentemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o un 95 % con un péptido que tiene la secuencia de Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30.

65 También se describen péptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos un 50 % con respecto a un péptido que tiene la secuencia de Seq ID No: 37 o 38. Preferentemente el péptido tiene una identidad de secuencia de al menos un 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o con 95 % con un péptido que tiene la secuencia de Seq ID No: 37 o 38.

De acuerdo con un aspecto adicional la invención proporciona el uso de uno o más péptidos como se define en la reivindicación 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una herida.

La invención permite un método para tratar, prevenir o mejorar una herida en un sujeto que comprende administrar al sujeto uno o más péptidos obtenidos a partir del extremo C-terminal de una proteína Quemerina, o análogos o derivados de la misma.

De acuerdo con un aspecto adicional la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos como se define en la reivindicación 13 para uso en el tratamiento de una herida.

De acuerdo con un aspecto adicional la invención proporciona uno o más péptidos como se define en la reivindicación 18, para uso en el tratamiento y/o prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico. El péptido(s) puede reducir el nivel de uno o más mediadores inflamatorios, tales como citoquinas y quimioquinas.

De acuerdo con un aspecto adicional la invención proporciona uno o más péptidos como se define en la reivindicación 18, para uso en el tratamiento de una herida.

La persona con experiencia observará que cualquiera de las características preferentes discutidas anteriormente se puede aplicar a cualquiera de los aspectos de la invención.

A continuación se describirán realizaciones preferentes de la presente invención, simplemente a modo de ejemplo, con referencia a las siguientes figuras y ejemplos.

Figuras 1A-F - Las **Figuras 1A y 1B** ilustran que la Quemerina₁₄₀ suprime la producción de mediadores inflamatorios con macrófagos de una manera dependiente de la proteólisis. Los sobrenadantes de macrófagos o macrófagos activados (tratados con 100 ng/ml de LPS y 20 ng/ml de interferón gamma se sometieron a ensayo para expresión de citoquina usando ensayos de Luminex y ELISA. Las células se incubaron en presencia o ausencia de quemerina o dexametasona de murino recombinante a las dosis indicadas y en ausencia o presencia del inhibidor de proteasa, leupeptina (15 mg/ml). **Figura 1C** - Los niveles de ARNm de citoquina de macrófago se cuantificaron por qRT-PCR (IL-10, TGFβ) y se normalizaron con respecto a HPRT.

Figura 1D - los PMΦ se trataron previamente con quemerina (0,1 - 1 pM) ± toxina de pertussis (PTX; 200 ng/ml) antes de estimulación con LPS/IFNγ.

Figura 1E - los PMΦ se trataron previamente con quemerina (1 pM) durante 1 h ± PTX y a continuación se estimularon con LPS/IFNγ durante 4 h, 8 h o 15 h. ***, p < 0,001; **, p < 0,01; *, p < 0,05 con respecto a muestras tratadas con LPS/IFNγ. ###, p < 0,001; ##, p < 0,01; #, p < 0,05 con respecto a muestras tratadas con quemerina. **Figura 1F** - los macrófagos de peritoneo (PMΦ) se trataron previamente con quemerina (1 pM), quemerina (1 pM) + inhibidores de proteasa (Leupeptina [Leu], E-64, Pefabloc [Pef], Pepstatina A [Pep A], Calpeptina [Cal], inhibidor de Catepsina S [Cat S], inhibidor de Catepsina L [Cat L]) durante 1 h y a continuación se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFNγ (20 ng/ml) durante 15 h. Los gráficos muestran los valores medios ± ETM de 3-8 experimentos independientes, nd; límite inferior de detección para este ensayo, ns, no significativo;

Figura 2A - muestra el alineamiento de la secuencia de aminoácidos de Quemerina Humana (secuencia superior) y de Ratón (secuencia inferior) (Fig2).

Las secuencias de aminoácidos para la Quemerina Humana (Banco de Datos de Proteínas con n.º de registro NP_002880) y para la Quemerina de Murino (NP_082128) se alinearon y se analizaron usando el Cortador Peptídico (<http://www.expasy.org/tools/peptidecutter/>) para generar sitios de escisión de tripsina predichos (líneas verticales de color negro). La secuencia de longitud completa en letra negrita y de color gris es la secuencia de la PreProQuemerina (Seq ID No: 33 para ser humano y Seq ID No: 36 para ratón). La secuencia con los aminoácidos N terminales en color gris retirada es la secuencia de ProQuemerina (Seq ID No: 32 para ser humano y Seq ID No: 35 para ratón). La secuencia en letra negrita, con los aminoácidos N terminales y C-terminales en color gris retirada esta secuencia de la Quemerina (Seq ID No: 31 para ser humano y Seq ID No: 34 para ratón).

También se proporcionan secuencias para los péptidos C-terminales C11m (Seq ID No: 1), C13m (Seq ID No: 2), C15m (Seq ID No: 3) y C17m (Seq ID No: 4);

Figura 2B - ilustra que los péptidos obtenidos a partir de la porción C-terminal de la Quemerina suprimen la producción de mediador pro-inflamatorio mediante macrófagos activados. En esta figura la referencia a los péptidos C13, C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C13m, C15m y C17m, respectivamente;

Figura 3 - ilustra que los péptidos de Quemerina presentan pocas propiedades quimiotácticas de macrófagos en comparación con la Quemerina₁₄₀. En esta figura la referencia a los péptidos C11, C13, C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C11m, C13m, C15m y C17m, respectivamente;

Figuras 4A-H - muestran quimiotaxis mediada por quemerina, péptidos de quemerina y sobrenadantes tratados con quemerina. Se permitió que los PMΦ ($0,4 \times 10^6$) con o sin tratamiento previo con toxina Pertussis durante 30 min (PTX; 200 ng/ml) mirarán hacia el agente quimioattractor (**Figura 4A**; rmQuemerina, **Figura 4B**; C15, **Figura 4C**; C11, **Figura 4D**; C13, **Figura 4E**; C19, **Figura 4F**; C6, **Figura 4G**; C8) en el pocillo inferior de una cámara de Boyden modificada durante 4 h. **Figura 4H** - Se permitió que los PMΦ ($7,5 \times 10^5$) migraran hacia medios acondicionados de macrófagos sin tratar y macrófagos tratados con LPS/IFN γ \pm Quemerina o C15 en el pocillo inferior de una cámara de Boyden modificada durante 4 h. Los gráficos indican el promedio del Índice de Migración \pm ETM para cada grupo de tratamiento (n = 4 experimentos independientes). ***, P < 0,001; **, P < 0,01; *, P < 0,05 con respecto a PMΦ + PTX (ensayo t de Student). En esta figura la referencia a los péptidos C11, C13, C15 y C19 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C11m, C13m, C15m y C19m, respectivamente;

Figura 5 - ilustra que los macrófagos presentan una reducción de la quimiotaxis hacia medios acondicionados a partir de macrófagos tratados con Quemerina. En esta figura la referencia a los péptidos C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C15m y C17m, respectivamente;

Figura 6 - ilustra que la Quemerina15-ratón suprime la peritonitis inducida con Zimosán. En esta figura, la referencia al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m. Z se refiere a Zimosán;

Figuras 7A-G - muestran que la quemerina15 mejora la peritonitis inducida con zimosán en ratones. **Figuras 7A y 7B** - los ratones C57B16/J se dosificaron por i.p con PBS o quemerina15 (0,32 ng/kg) seguido de inyección con PBS o zimosán (10 μ g, $\sim 2 \times 10^6$ partículas por cavidad) 1 h más tarde. Las células de exudado peritoneal se recogieron mediante lavado peritoneal en múltiples momentos (Figura 7A y 7B; 5-6 ratones/tratamiento) o después de 4 h (Figuras 7C-7E; 6-15 ratones/grupo).

Figuras 7C-7E - los recuentos de células totales en fluido de lavado se cuantificaron y la composición celular (neutrófilos con respecto a fagocitos mononucleares) se determinó usando análisis de FACS. Las células se bloquearon con 2,4G2 anti-Fc γ RII/III y se tiñeron con Ly-6G-PE y 7/4-FITC. Se construyeron ventanas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4high, Ly-6Ghigh) y monocitos inflamatorios (Mo; 7/4high, Ly-6Glow).

Figura 7E - se muestran representaciones de FACS representativas para cada grupo de tratamiento a las 4 h después del zimosán. **Figura 7F** - el fluido de lavado peritoneal se sometió a ensayo para TNF α y KC con ELISA e IL-6, IL-1 β y MCP-1 con ensayo Luminex. C15; Quemerina15, Z; Zimosán. ***, P < 0,001; **, P < 0,01 ** con respecto a animales tratados con zimosán (ensayo t de Student). **Figura 7G** - Los ratones (6-8/tratamiento) se dosificaron por i.p con zimosán (10 μ g) y con C15 (8 pg) o PBS en cualquiera de 1 h de antelación (tratamiento previo con C15) o 2 h después (tratamiento posterior con C15). El lavado peritoneal se realizó 4 h después de la estimulación con zimosán. En esta figura la referencia al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figuras 8A-D - muestran que el anticuerpo anti-quemerina neutraliza especies de quemerina e intensifica la inflamación peritoneal. **Figura 8A** - los PMΦ se usaron en ensayos de quimiotaxis de macrófago (realizados como se detalla en la Fig. 7) y se permitió que migraran hacia RANTES, quemerina o C15 con o sin anticuerpo anti-rmQuemerina o IgG de control. Los gráficos indican el promedio del Índice de Migración \pm ETM para cada grupo de tratamiento (n = 4 experimentos independientes). ***, P < 0,001; **, P < 0,01; *, P < 0,05 con respecto al agente quimioattractor.

Figura 8B - los PMΦ se trataron previamente con C15 1 pM o quemerina 1 pM con o sin anticuerpo anti-rmQuemerina o IgG de control durante 1 h y a continuación se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h. La expresión promedio de RANTES \pm ETM en sobrenadantes de macrófagos después de 16 h se determinó con ELISA (n = 4 experimentos independientes). **, P < 0,01; *, P < 0,05 con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN γ . **Figuras 8C y 8D** - los ratones C57B16/J se dosificaron por i.p con PBS, anticuerpo anti-rmQuemerina (100 ng/ratón) o IgG de control (100 ng/ratón) seguido de inyección con PBS o zimosán (10 μ g/cavidad) 1 h más tarde. Las células de exudado peritoneal se recogieron mediante lavado peritoneal 4 h y 24 h después de la inyección de zimosán y se procesaron como se ha destacado en la Fig. 7. Z; zimosán, ChAB; anticuerpo anti-rmQuemerina. **, P < 0,01 con respecto a ratones estimulados con zimosán. En esta figura la referencia al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figura 9 - ilustra que la inyección de 0,32 ng/kg de C15m solo no induce recuperación de neutrófilos o macrófagos pero reduce los niveles de TNF α peritoneal. En esta figura la referencia al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figura 10 - ilustra que un péptido de Quemerina13-humana modificado suprime la expresión de la transcripción de RANTES y TNF α en macrófagos de murino. En esta figura la referencia al péptido hC13 se refiere al péptido C13h modificado;

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

Figura 12 - ilustra que Quemerina15-ratón y Quemerina17-ratón suprimen la secreción de TNF α mediante

macrófagos de murino estimulados con Zimosán. En esta figura la referencia a los péptidos C15 y C17 se refiere a los péptidos descritos anteriormente como C15m y C17m, respectivamente. Dexa se refiere a dexametasona;

Figura 13 - es un análisis en damero que demuestra que Quemerina140 y Quemerina15-ratón inducen una quimiotaxis de macrófagos real y no quimioquinesis. En esta figura la referencia al péptido C15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m;

Figuras 14A-B - muestran que la quemerina15 suprime la recuperación de monocitos y neutrófilos en peritonitis por zimosán con respecto al intervalo de dosis de C15 y zimosán. **Figura 14A** - los ratones C57B16/J (5-6 animales/tratamiento) se dosificaron por i.p con PBS o C15 (0,32 ng/kg) seguido de inyección con intervalo de dosis de PBS o zimosán (10 µg - 1 mg; A) 1 h más tarde. **Figura 14B** - Los ratones (5-6 animales/tratamiento) se dosificaron por i.p con intervalo de dosis de PBS o C15 (4-40 pg/ratón seguido de inyección con PBS o zimosán (100 µg; 2×10^6 partículas/cavidad) 1 h más tarde. Las células de exudado peritoneal se recogieron mediante lavado peritoneal 4 h después de la estimulación con zimosán; 5-6 ratones/grupo). El número total de células en el fluido de lavado se cuantificó y la composición celular (neutrófilos con respecto a fagocitos mononucleares) se determinó usando análisis de FACS como se ha descrito en la Fig. 7. C15; Quemerina15, Z; Zimosán. ***, $P < 0,001$; **, $P < 0,01$; *, $P < 0,05$ * con respecto animales tratados con zimosán (ensayo t de Student). En esta figura la referencia al péptido C15 o quemerina15 se refiere al péptido descrito anteriormente como C15m; y

Figura 15 - muestra la fluorimetría para el reconocimiento de zimosán por macrófagos expresado como índice de reconocimiento relativo. Los experimentos se realizaron en presencia o ausencia de diversas concentraciones de C15. Los datos representan la media (\pm e.t.m) de cuatro experimentos combinados, normalizados. En el presente documento la referencia a Quemerina140 o C140 es la referencia a la proteína Quemerina de ratón de 140 aminoácidos (Quemerina-140-ratón) de la Secuencia ID no: 34.

Ejemplos

La Quemerina140 ejerce efectos antiinflamatorios sobre macrófagos activados que están anulados con inhibidores de proteasa

Los estudios previos demostraron que las serina proteasas liberadas por células polimorfonucleares (PMN) después de desgranulación escinden el extremo C-terminal de la ProQuemerina y liberan su potencial quimiotáctico (Wittamer V *et al.* J Immunol. 1 de Jul de 2005; 175 (1): 487-493). Sin embargo, el efecto antiinflamatorio de péptidos producidos por el procesamiento proteolítico adicional de la Quemerina es nuevo y de la invención.

Los macrófagos de peritoneo de murino (PM θ , también denominados PM Φ en el presente documento) se cultivaron en diversas condiciones: Sin tratar; LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h; tratamiento previo con Quemerina (1 pM) durante 1 h y a continuación con LPS/IFN γ durante 15 h; Leupeptina (inhibidor de proteasa; 15 mg/ml) y Quemerina (1 pM) durante 1 h y a continuación con LPS/IFN γ durante 15 h; o Dexametasona (control positivo; tratamiento previo 1 µM durante 1 h y a continuación con LPS/IFN γ durante 15 h.

Los sobrenadantes de los macrófagos tratados con Quemerina + lipopolisacárido/interferón- γ (LPS/IFN γ) se analizaron para contenido de quimioquinas y los resultados mostraron que las células tratadas con quemerina presentaban niveles significativamente más bajos de TNF α (70 %), IL-12 p40 (54 %), RANTES (CCL5; 40 %), IL-6 (42 %) e IL-1 β (60 %) en comparación con las muestras tratadas con LPS/IFN γ (n = 5; p < 0,001 Figura 1A y 1B). Este efecto antiinflamatorio fue inhibido por inhibidores de proteasas de amplio espectro (leupeptina), que cuando se añaden a los macrófagos evitan cualquier efecto antiinflamatorio, lo que ilustra la importancia de la escisión de la Quemerina adicional en la producción de estos péptidos antiinflamatorios (Figura 1A y Figura 1F).

Además se demostró que estos efectos eran específicos de la Quemerina mediante el uso de un anticuerpo neutralizante anti-Quemerina; que retiraba el efecto antiinflamatorio de la Quemerina (Figura 8B).

Los gráficos de barras de la Figura 1A muestran la expresión media de citoquinas tal como se determina con el ensayo Luminescence \pm ETM. Los experimentos se realizaron con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. Se muestran datos representativos de tres experimentos independientes que usan células de diferentes grupos de ratones C57B16/J. p < 0,001 ***, p < 0,01 ** con respecto a muestras tratadas con LPS/IFN γ a menos que se indique de otro modo. Dexa se refiere a Dexametasona (1 mM).

La Figura 1B muestra resultados similares como se ha discutido anteriormente con respecto a la Figura 1A, con datos adicionales que muestran los efectos de la quemerina a diferentes concentraciones de 0,1 pM, 0,5 pM y 1,0 pM.

Además, la Figura 1C muestra que la quemerina inducía la expresión del ARNm para las citoquinas antiinflamatorias TGF β (54 %) e IL-10 (89 %).

Los efectos de la quemerina eran dependientes de la dosis con respuestas máximas observadas a 1 pM (Fig. 1B y

Fig. 1C), y eran sensibles a la toxina Pertussis, lo que indica la implicación de un GPCR unido a Gai (Fig. 1D).

Además, se observaron efectos antiinflamatorios a las 4 h, 8 h, y 15 h después de la administración de LPS/IFN γ ? Y se anularon con PTX en todos los momentos (Fig. 1E).

5 Los estudios previos han demostrado que las serina proteasas liberadas por granulocitos después de desgranulación extienden el extremo C-terminal de la proquermerina y liberan su potencial quimiotáctico (Wittamer, V., *et al.*, (2005), *J Immunol* 175: 487-493). Se investigó la posibilidad de que la quemerina de murino pueda experimentar un procesamiento proteolítico adicional por enzimas liberadas después de la activación de M Φ de murino. Como se ha discutido anteriormente en relación a la Figura 1A, la coadministración de quemerina con Leupeptina (un inhibidor de serina y cisteína proteasa) eliminaba sus efectos antiinflamatorios (Figura 1A y Figura 1F). Este efecto también se demostró para E-64 (un inhibidor de la cisteína proteasa), aunque el inhibidor de proteasa ácido, Pepstatina A, y el inhibidor de serina proteasa, Pefabloc, no ejercían ningún efecto sobre la supresión de la activación de M Φ mediada por quemerina (Figura 1F). Estos datos demuestran que la quemerina ejerce efectos y meritorios sobre la activación de M Φ de una manera dependiente de la cisteína proteasa. Un inhibidor de la cathepsina L (Z-FF-FMK), inhibidor de la cathepsina S (Z-FL-COCHO) y un inhibidor de calpaína I e II, calpeptina se usaron para sondear adicionalmente las cisteína proteasas específicas implicadas en la escisión de la quemerina (Figura 1F). se encontró que los efectos antiinflamatorios de la quemerina eran dependientes de las calpaínas y de la cathepsina S pero era independiente de la cathepsina L. Tomados en conjunto los resultados demuestran por primera vez que M Φ de murino activados de forma clásica son capaces de convertir la quemerina en inhibidores peptídicos potentes de la activación de M Φ mediante escisión mediada por cisteína proteasa específica de la molécula precursora, lo más probablemente implicando a la calpaína II y a la cathepsina S.

Péptidos de Quemerina C-terminal con actividad antiinflamatoria

25 Una serie de péptidos de 11-20 aa se diseñaron usando funciones de alineamiento de secuencias en Ensembl como un indicador de restos conservados importantes y denominados C11m (P144-A154; PHGYFLPGQFA Seq ID No: 1), C13m (P144-S156; PHGYFLPGQFAFS Seq ID No: 3), C15m (A140-A154; AGEDPHGYFLPGQFA Seq ID No: 4) y C17m (A140-S156; AGEDPHGYFLPGQFAFS Seq ID No: 6) C19 (A138-S156; AQAGEDPHGYFLPGQFAFS Seq ID No: 37), N19 (E23-K41; ELSETQRRSLQVALEEFHK Seq ID No: 44) y M20 (K86-K105; KPECTIKPNGRRRKLCLAIK Seq ID No: 45). La Figura 2A muestra un alineamiento de secuencias para algunos de estos péptidos. Los péptidos de quemerina (1 pM - 100 nM) se caracterizaron en el ensayo de activación de macrófagos de acuerdo con el protocolo descrito.

35 Las células PM θ de murino se cultivaron en diversas condiciones: Sin tratar, LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h; tratamiento previo de péptidos de Quemerina (a una concentración de 1 pM-100 nM) durante 1 h la continuación LPS/IFN γ durante 15 h. Las concentraciones presentadas representan las dosis eficaces óptimas para cada péptido en ambos ensayos. Los gráficos de barras de la Figura 2B presentan la expresión media de RANTES y proteína de TNF α \pm ETM. Los experimentos se realizaron con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. Se muestran datos representativos de cinco experimentos independientes que usan células de diferentes grupos de ratones C57B16/J. $p < 0,01$ **; $p < 0,001$ *** con respecto a nuestras tratadas con LPS/IFN γ .

45 Los péptidos C-terminales C13m (100 pM), C15m (1 pM) y C17m (1 pM) suprimían la secreción de RANTES inducida por LPS/IFN γ (C13m - 32 %; C15m - 41 %; C17m - 49 %) y la expresión de TNF α (C13m - 10 %; C15m - 56 %; C17m - 66 %, Fig 2B). C15m y C17m inhibían la activación de macrófagos en un alcance similar a C140 cuando se usa a la misma concentración.

50 En la Tabla 1, en la que los péptidos C-terminales, C13 y C19, suprimían de forma moderada la expresión de RANTES y TNF α inducida por LPS/IFN γ , se muestran resultados similares con una dosis óptima de 100 pM (Tabla 1). Sin embargo, la Quemerina15 (C15), mantenía la actividad antiinflamatoria mostrada por la quemerina sometida a proteólisis y a la expresión de citoquinas con una eficacia y potencia similares a las de la quemerina (dosis óptima de 1 pM). Además, C11, el péptido N-terminal (N19), péptido en el centro de la cadena (M20), y los péptidos de control (C15 codificado; C15-S, GLFHDQAGPPAGYEF; Seq ID No: 39, y C15 mutante; C15-M, AGEDPHGYALPGQAA; Seq ID No: 40) estaban desprovistos de actividad antiinflamatoria en el ensayo de activación de M Φ . También se encontró que los péptidos de 6 aa (RALRTK; Seq ID No: 41) y de 8 aa (FSRALRTK; Seq ID No: 42) retirados durante la escisión de la proquermerina por proteasas de las cascadas de coagulación y fibrinolíticas, denominados C6 y C8, respectivamente, no tenían actividad antiinflamatoria detectable en ensayo de activación de M Φ .

Citoquina	Porcentaje de inhibición de expresión de citoquina inflamatoria inducida por LPS/IFN γ										
	Quemerina	C6	C8	C11	C13	C15	C15-S	C15-M	C19	N19	M20
TNF α	70	0	0	0	10	61	0	0	21	0	0
RANTES	40	0	0	0	32	47	0	0	41	0	0
IL-1 β	60			-		54	-		-		-
IL-12 p40	54			-		47	-		-		-
IL-6	42			-		43	-		-		-

Tabla 1

Con referencia a la Tabla 1, la actividad antiinflamatoria de los péptidos obtenidos a partir de quemerina – PM Φ de Murino se cultivaron como se ha descrito para la Fig. 1B y se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h con/sin tratamiento previo con péptidos (0,1 pM-100 nM) durante 1 h. Cuando los péptidos presentaban propiedades antiinflamatorias, el porcentaje de inhibición de la activación de macrófagos inducida por LPS/IFN γ representa un efecto con dosis óptima (Quemerina y C15 1 pM o C13 y C19 100 pM). Las secuencias de los péptidos son: C11 (P144-A154; PHGYFLPGQFA), C13 (P144-S156; PHGYFLPGQFAFS), C15 (A140-A154; AGEDPHGYFLPGQFA), C19 (A138-S156; AQAGEDPHGYFLPGQFAFS; Seq ID: No. 37), N19 (E23-K41; ELSETQRRSLQVALEEFHK Seq ID No: 44) y M20 (K86-K105; KPECTIKPNGRRRKCLACIK Seq ID No. 45). Péptidos de control: C15 codificado (C15-S; GLFHDQAGPPAGYEF) y C15 mutante (C15-M; AGEDPHGYALPGQAA; F148A y F153A). Los datos representan el porcentaje de inhibición promedio de la producción de citoquinas por macrófagos activados de forma clásica a partir de 4-8 experimentos independientes como se determina mediante ensayo de ELISA y Luminex.

15 La Quemerina140, pero no sus péptidos antiinflamatorios obtenidos a partir de C-terminal, es un agente quimioattractor de macrófagos potente

Para demostrar las propiedades quimioattractoras de macrófagos de C140 se utilizaron ensayos de cámara de Boyden modificada. La Quemerina140 de ratón presenta una curva con forma de campana habitual con quimiotaxis óptima observada a 10 nM, que disminuye a partir de ese momento, supuestamente después de la desensibilización o descomposición del receptor del gradiente quimioattractor (Figura 3). Esto también se muestra en la Figura 4A, con datos adicionales que muestran los efectos de apartamiento previo con toxina Pertussis (PTX: 200 ng/ml).

Se permitió que las PM Φ ($0,5 \times 10^6$) migraran hacia el agente quimioattractor (Quemerina140 o péptidos de Quemerina) en el pocillo inferior de una cámara de Boyden modificada durante 4 h. Los filtros se fijaron en formalina al 4 %, a continuación los núcleos celulares migrados se tiñeron con DAPI y se visualizaron. Como control negativo se usaron medios sin suero (SFM) y como control positivo el agente quimioattractor de macrófagos RANTES (25 ng/ml; 3 nM). Los datos gráficos indican el Índice de Migración promedio (% de área umbral de agente quimioattractor/% de área umbral de SFM) \pm ETM para cada grupo de tratamiento (n = 5-6). $p < 0,001$ ***; $p < 0,01$ **; $p < 0,05$ * con respecto a los pocillos tratados con SFM.

Se observó que C11m, C13m y C15m (1 pM - 100 nM) tenían poca actividad quimiotáctica en comparación con C140 (1 pM - 50 nM) o la quimioquina CC RANTES de control positivo (25 ng/ml; 3 nM). La migración de macrófagos máxima se observó para C15m 100 pM y C13m y C11m 10 nM. Sin embargo, C17m no presentaba actividad quimiotáctica a todas las concentraciones sometidas a ensayo (0,1 pM - 500 nM; n=5 experimentos independientes; (Figura 3). Este resultado también se muestra en las Figuras 4B-D, con datos adicionales que muestran los efectos del tratamiento previo con toxina Pertussis (PTX: 200 ng/ml). Con referencia a la Figura 4E, C19 tampoco presentaba actividad quimiotáctica a todas las concentraciones sometidas al ensayo (0,1 pM - 500 nM; Figura 4E). Por lo tanto se identificó un péptido obtenido a partir de la quemerina que retiene la actividad antiinflamatoria pero que no presenta actividad quimiotáctica para los M Φ , lo que indica la existencia de distintos componentes específicos de funciones de quemerina que se podrían aprovechar por vía terapéutica. Los péptidos obtenidos a partir de la proquemerina, C6 y C8, que se encontró que estaban desprovistos de actividad antiinflamatoria de M Φ , también eran incapaces de inducir la migración de M Φ a todas las concentraciones sometidas a ensayo (0,1 pM - 500 nM; Fig.4F-G). Por lo tanto parece que los datos indican que la principal especie quimiotáctica es cualquiera de la propia molécula de quemerina escindida, o un péptido aún sin identificar.

Ejemplo adicional que muestra que la quemerina y la quemerina 15 inducen supresión generalizada de la producción de agente quimioattractor por macrófagos

Dado el papel bien establecido de los agentes quimioattractores obtenidos a partir de M Φ en la recuperación de células inmunes durante la inflamación (Glabinski, A.R., *et al.*, (1998). *Neuroimmunomodulation* 5: 166-171; Huang, D. J. *et al.*, (2001). *J. Exp. Med.* 193: 713-726), se usó medio acondicionado a partir de M Φ no tratado y M Φ tratado con quemerina + LPS/IFN γ , C15 + LPS/IFN γ y LPS/IFN γ solo en ensayos de quimiotaxis para evaluar cómo podría

influir la supresión de la activación de MΦ por la quemerina y el péptido C-terminal sintético, C15, en la recuperación adicional de MΦ (véase la Figura 4H). El propio medio acondicionado con MΦ sin tratar no presentaba actividad quimiotáctica para MΦ (índice de migración $1,0 \pm 0,15$); sin embargo, el medio de macrófagos tratado con LPS/IFN γ inducía un aumento notable en la quimiotaxis de MΦ (Índice de migración $9,3 \pm 0,4$; Figura 4H). Además, los MΦ presentaban una reducción de la quimiotaxis hacia medios acondicionados de macrófagos tratados con quemerina + LPS/IFN γ y C15 + LPS/IFN γ en un 49 % y un 55 %, respectivamente (Figura 4H). Esto indica que quemerina y C15 inducen una supresión general de una amplia gama de agentes quimioattractores de MΦ obtenidos a partir de MΦ en la medida en la que la actividad quimiotáctica del medio acondicionado se ve influida.

Además, los ensayos de quimiotaxis secundaria revelaban una quimiotaxis de macrófagos suprimida hacia sobrenadantes de macrófagos tratados con Quemerina140-ratón, 5-ratón y Quemerina17-ratón. Estos resultados muestran que el tratamiento previo de macrófagos activados con C15m y C17m disminuye la cantidad y/o bioactividad de agentes quimioattractores liberada por macrófagos, y por lo tanto estos péptidos pueden reducir de forma significativa la recuperación continua de monocitos/macrófagos a sitios de inflamación.

En ensayos de quimiotaxis secundaria se usaron medios acondicionados a partir de macrófagos tratados con C140 + LPS/IFN γ , C15m + LPS/IFN γ , C17m + LPS/IFN γ y LPS/IFN γ solo para evaluar las posibles repercusiones patofisiológicas asociadas con la supresión de la activación de macrófagos por C140 y sus péptidos C-terminales.

Se permitió que las células ($0,5 \times 10^6$) migraran hacia agente quimioattractor (péptidos de Quemerina) o medio acondicionado en el pocillo inferior de una cámara de Boyden modificada durante 4 h. Como control negativo se usó medio sin suero (SFM). Los filtros se fijaron en formalina al 4 %, a continuación los núcleos se tiñeron con DAPI y se visualizaron. Los gráficos de barras indican el Índice de Migración promedio (% de área umbral de agente quimioattractor/% de área umbral de SFM) + ETM para cada grupo de tratamiento. Cada barra representa al menos pocillos por triplicado y 6 fotografías tomadas por tratamiento. $p < 0,001$ ***; la significancia $p < 0,01$ ** es relativa a medio acondicionado con LPS/IFN γ a menos que se indique de otro modo. AB se refiere a anticuerpo de Quemerina anti-murino.

Como se puede observar a partir de los resultados presentados en la Figura 5, el propio medio acondicionado con macrófagos no presentaba actividad quimiotáctica para macrófagos, sin embargo, el medio de macrófagos tratado con LPS/IFN γ inducía un aumento drástico en la quimiotaxis de macrófagos. Además, los macrófagos presentaban una reducción de la quimiotaxis hacia medios acondicionados de macrófagos tratados con C140 + LPS/IFN γ , C15m + LPS/IFN γ y C17m + LPS/IFN γ , lo que indica la capacidad de C140, C15m y C17m para inducir una supresión general de una amplia gama de agentes quimioattractores de macrófagos.

Para excluir la posibilidad de que los sobrenadantes tratados con Quemerina albergaran proteínas/péptidos quimiotácticos obtenidos a partir de Quemerina, los sobrenadantes se incubaron con un anticuerpo de Quemerina neutralizante antes de la evaluación de la migración de macrófagos. No parecía que la Quemerina contribuyera a la migración en sobrenadantes tratados con Quemerina.

La Quemerina15-ratón Suprime la peritonitis inducida por Zimosán

La inflamación peritoneal se puede inducir mediante inyección intraperitoneal de partículas de Zimosán (un componente de la pared celular de la levadura) que provoca una respuesta inflamatoria aguda. La peritonitis inducida por Zimosán sigue una acumulación de neutrófilos dependiente del tiempo bien descrita y a continuación monocitos en cavidades peritoneales de ratón (para una revisión véase Lawrence T *et al.* Nat Rev Immunol. Oct de 2002; 2 (10): 787-795). Este modelo se ha utilizado para demostrar las propiedades de pro-resolución de mediadores establecidos, Lipoxina A4 y anexina-1, que por lo general acortando el transcurso del tiempo de inflamación con una restauración más temprana de la estructura tisular y función y supresión de extravasación de neutrófilos y monocitos. Los experimentos previos informados en la bibliografía han usado una gama de dosis de partículas de Zimosán A ($10 \mu\text{g} - 1 \text{mg}$) (Taylor PR *et al.* Eur J Immunol. Jul de 2005; 35 (7): 2163-2174; Arita M *et al.* J. Biol. Chem. 11 de Agosto, 2006 2006; 281 (32): 22847-22854).

Dado el potencial quimiotáctico elevado de la quemerina y el requisito inherente para la proteólisis, se usó el péptido sintético C-terminal, quemerina15, para caracterización *in vivo* de efectos antiinflamatorios en el modelo de peritonitis estéril, dado que C15 está muy desprovisto de actividad quimiotáctica (Fig. 3 y Fig. 4B) aunque ejerce efectos antiinflamatorios que son comparables con los de la quemerina sometida a proteólisis (Tabla 1).

Con referencia a los resultados mostrados en la Figura 6, este estudio uso $10 \mu\text{g}$ por ratón (1-2 partículas por macrófagos residente) ya que se cree que esto representa de manera más cercana una dosis patofisiológica.

De manera más específica, los ratones C57B16/J macho (8-12 semanas) se inyectaron por vía intraperitoneal con 0,5 ml de PBS o 0,5 ml de Quemerina15-ratón ($0,32 \text{ ng/kg}$) seguido de inyección con 0,5 ml de PBS o Zimosán (2×10^6 partículas por cavidad) una hora más tarde. Después de 4 horas los animales se sacrificaron y la cavidad peritoneal se lavó con 5 ml de PBS - EDTA 3 mM. Los recuentos celulares totales se obtuvieron usando el ensayo de exclusión de azul de Tripano. Para determinación de la composición celular (neutrófilos con respecto a fagocitos

mononucleares), las células se bloquearon con mAB 2.4G2 anti-FcγRII/III durante 5 mins se tiñeron con Ly-6G anti-ratón conjugado con PE y mAB 7/4 anti-ratón conjugado con FITC durante 10 mins. Las células se fijaron en formaldehído al 1 % antes de análisis de FACS con el software CellQuest. Se construyeron ventanas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4^{high}, Ly-6G^{high}) y los monocitos inflamatorios (Mo; 7/4^{high}). C15 se refiere a Quemerina15-ratón. Z se refiere a Zimosán, $p < 0,01$ ** ; $p < 0,05$ * con respecto a tratado con Zimosán.

Las poblaciones de neutrófilos (7/4^{high}, Ly-6G^{high}), monocitos (7/4^{high}, Ly-6G^{low}) y macrófagos residentes (7/4^{low}, Ly-6G^{low}) se determinaron de acuerdo con Gordon S y Taylor PR Nat Rev Immunol. 2005; 5 (12): 953; Taylor PR *et al.* Eur J Immunol. Agosto de 2003; 33 (8): 2090-2097; y Taylor PR *et al.* Eur J Immunol. Jul 2005; 35 (7): 2163-2174.

El resultado de este estudio muestra que los ratones tratados con C15m a una dosis de 0,32 ng/kg (8 pg/ratón) presentaba una reducción de la recuperación de monocitos y neutrófilos provocados por Zimosán en un 42 % y un 52 %, respectivamente (Figura 6). Los niveles de TNFα también se redujeron en ratones tratados con C15m.

El resultado mencionado anteriormente se investigó adicionalmente. Para determinar las propiedades antiinflamatorias del péptido C15 *in vivo* se realizó un experimento de transcurso del tiempo que se prolongó durante 48 h. Las poblaciones de neutrófilos (7/4^{high}, Ly-6G^{high}) y monocitos (7/4^{high}, Ly-6G^{low}) en fluido de lavado peritoneal se determinaron mediante análisis de FACS de acuerdo con protocolos publicados (Taylor, P.R. *et al.*, (2005). *Eur J Immunol* 35: 2163-2174; Taylor, P.R., (2003). *Eur J Immunol* 33: 2090-2097). La administración de zimosán en la cavidad peritoneal del ratón produjo una extravasación dependiente del tiempo de células inflamatorias en la cavidad peritoneal, que seguía el perfil habitual de una respuesta inflamatoria aguda (Fig. 7A-B, línea sólida). Los neutrófilos fueron los primeros leucocitos en infiltrar la cavidad, detectable a las 2 h después del zimosán con una neutrofilia máxima que se produce a las 4 h ($1,95 \times 10^6$ células). El flujo de monocitos en la cavidad peritoneal inflamada se detectó primero después de 4 h ($0,69 \times 10^6$ células), con un máximo a las 24 h después de la inyección de zimosán ($1,25 \times 10^6$ células) y que disminuye a partir de ese momento. Tratamiento previo con C15 a una dosis de 8 pg/ratón ($\approx 0,32$ ng/kg) 1 h antes de la estimulación con zimosán adelantó la neutrofilia máxima hacia 2 h con aproximadamente un 50 % de la magnitud de la de los ratones estimulados con zimosán (que se reduce de $1,25 \times 10^6$ a $0,62 \times 10^6$ células; Fig. 7A, línea discontinua). La supresión significativa de la infiltración de neutrófilos por C15 se observó a las 2 h, (50 %), 4 h (66 %) y a las 24 h (50 %). Una sola dosis de 8 pg de péptido C15 también fue eficaz para reducir el número de monocitos peritoneales en cavidades inflamadas en todos los momentos, con una supresión superior a un 60 % observada a las 4 h (63 %), 8 h (61 %), y 48 h (64 %; Fig. 7B, línea discontinua). La tasa de infiltración de monocitos más elevada se produjo a las 2-4 h después de la inyección de zimosán ($0,51 \times 10^6/h$) y la administración de C15 redujo la tasa de flujo en la cavidad inflamada ($0,18 \times 10^6/h$). Por lo tanto, una sola dosis de péptido C15 antes de la estimulación con zimosán proporcionaba una protección significativa contra la inflamación peritoneal inducida por zimosán durante el periodo de duración de 48 h del experimento.

El experimento del transcurso del tiempo identificó el momento a las 4 h después de zimosán como un punto apropiado para la validación de la actividad antiinflamatoria de C15. En este estudio una sola dosis de C15 producía una reducción dependiente de la dosis en la recuperación de neutrófilos y monocitos provocada por zimosán. Que era máxima a 8 pg/ratón de C15 ($\approx 0,32$ ng/kg; Fig. 7C-E y 16A-B), aunque los efectos antiinflamatorios significativos se observaron con una dosis tan baja como 4 pg/ratón ($\approx 0,16$ ng/kg; Fig. 14B). Cuando C15 se administraba 1 h antes de la estimulación con zimosán, los recuentos de neutrófilos se reducían de $1,9 \times 10^6$ a $0,78 \times 10^6$ (disminución de un 63 %; Fig. 7C) y los niveles de monocitos de $0,69 \times 10^6$ a $0,30 \times 10^6$ (disminución de un 62 %; Fig. 7D, las representaciones de FACS representativas en el momento a las 4 h se muestran en la Fig. 7E). La administración de C15 también disminuía de forma notable la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en el fluido de lavado peritoneal a las 4 h, incluyendo TNFα (51 %), IL-1β (67 %), IL-6 (67 %), MCP-1 (59 %), y KC (38 %; Fig. 7F). También se encontró que los péptidos de control, C15-S y C15-M, que estaban desprovistos de actividad antiinflamatoria *in vitro* (Tabla 1) no eran protectores cuando se administraban *in vivo* a la misma dosis y tiempo que C15 tal como se considera mediante los niveles de monocitos y neutrófilos (Fig. 7C-D). La supresión significativa de la recuperación de monocitos (de $0,69 \times 10^6$ a $0,42 \times 10^6$ células; disminución de un 42 %) y neutrófilos (de $1,9 \times 10^6$ a $0,83 \times 10^6$ células; disminución de un 60 %) todavía se observaba 4 h después de la inyección de zimosán cuando se proporcionaba la misma dosis de C15 2 h después de la inyección de zimosán (Fig. 7G). Esto demuestra que C15 puede reducir la recuperación de neutrófilos y monocitos en un entorno inflamatorio ya establecido, lo que proporciona otra indicación de que C15/derivados de C15 pueden representar farmacóforos atractivos que se dirigen a patologías inflamatorias.

El bloqueo de especies de quemerina endógena empeora la inflamación peritoneal

Un papel endógeno potencial para quemerina y péptidos obtenidos a partir de quemerina se investigó mediante inyección por i.p en ratones con un anticuerpo anti-rmQuemerina policlonal neutralizante (ChAb) o una IgG de control 1 h antes de una estimulación con zimosán de 4 h o 24 h. Previamente se encontró que ChAb pero no la IgG de control era capaz de inhibir la quimiotaxis de MΦ inducida por C15 y por quemerina y efectos antiinflamatorios *in vitro* (Fig. 8A-B). *In vivo* se encontró que la neutralización de especies de quemerina endógena daba como resultado un aumento de un 63 % de los recuentos de neutrófilos peritoneales y un aumento de un 45 % en los niveles de monocitos en el momento de 4 h con respecto a ratones tratados con IgG de control y un aumento de un 170 % y de

un 86 % que los niveles de neutrófilos y monocitos peritoneales 24 h después de la inyección de zimosán (Fig. 8C-D). Este empeoramiento de la inflamación peritoneal con respecto a un periodo de 24 h sugiere un papel antiinflamatorio endógeno importante para las especies de quemerina *in vivo*.

5 **La Quemerina 15-ratón sola no induce recuperación de neutrófilos o macrófagos pero reduce los niveles de TNF α**

A los ratones C57B16/J macho (8-12 semanas) se les inyectaron por vía intraperitoneal 0,5 ml de PBS o 0,5 ml de Quemerina15-ratón (0,32 ng/kg). Después de 4 horas, los tres animales por un grupo de tratamiento se sacrificaron y la cavidad peritoneal se lavó con 5 ml de PBS-EDTA 3 mM. Los recuentos de células totales se obtuvieron usando el ensayo de exclusión con azul de Tripano. Para la determinación de la composición celular (neutrófilos con respecto a fagocitos mononucleares), las células se bloquearon con mAB 2.4G2 anti-Fc γ RII/III durante 5 mins y se tiñeron con Ly-6G anti-ratón conjugado con PE y mAB 7/4 anti-ratón conjugado con FITC durante 10 mins. Las células se fijaron en formaldehído al 1 % antes del análisis de FACS con el software CellQuest. Se construyeron ventanas alrededor de dos poblaciones, los neutrófilos (N; 7/4^{high}, Ly-6G^{high}) y monocitos inflamatorios (Mo; 7/4^{high}, Ly-6G^{low}). C15 se refiere a Quemerina 15-ratón. $p < 0,01$ ** con respecto a tratado con PBS. Ns se refiere a sin diferencia estadísticamente significativa $p > 0,05$.

Como se puede observar a partir de los resultados de la Figura 9, 0,32 ng/kg de C15m no causan migración de monocitos o neutrófilos. Sin embargo, se observa una reducción significativa de TNF α .

Este modelo, que estudia la peritonitis estéril en ratones, se usa ampliamente en medicina y farmacología experimentales, y representa la inflamación leve causada por traumatismo o infección tisular moderados. Los resultados indican que la C15m es capaz de conseguir un efecto antiinflamatorio terapéutico.

25 **La Quemerina13-humana modificada suprime la expresión de la transcripción de Rantes y TNF α en macrófagos de murino**

Los macrófagos peritoneales de murino (PM θ) se cultivaron en diversas condiciones: Sin tratar, LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h, cargamento previo con Quemerina13-humana modificada (1 nM) durante 1 h y a continuación con LPS/IFN γ durante 15 h. Los gráficos de barras muestran la expresión media de la transcripción de citoquina determinada por qRT-PCR y normalizada al elemento constitutivo, hipoxantina fosforibosiltransferasa, HPRT. Los experimentos se realizaron con determinaciones por triplicado para cada tratamiento, $n = 1$ experimento independiente. $p < 0,01$ **; $p < 0,05$ * con respecto a nuestras tratadas con LPS/IFN γ a menos que se indique de otro modo. La secuencia del péptido C13h modificado es NH₂-FHSFYFPGQFAFS-COOH (Seq ID No: 43) - en esta secuencia el P N terminal en C13h se ha reemplazado por el aminoácido F, y por lo tanto el péptido se denomina C13h modificado.

Como se puede observar a partir del resultado de la Figura 10, C13h modificada reducía de forma significativa la expresión de TNF α y RANTES.

40 **La Quemerina 17-ratón No influye en la quimiotaxis de macrófagos inducida por C140**

Los PM θ se recuperaron siguiendo una estimulación peritoneal de 4 días con perlas de BioGEL. Las cavidades peritoneales de ratones C57B16/J macho se lavaron con 5 ml de PBS-EDTA 2 mM. Las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en RPMI suplementado con BSA al 0,5 % y Hepes 25 mM. Se permitió que las células ($0,5 \times 10^6$) migraran hacia el agente quimioattractor (C140, C17m o C17m + C140) en el oficio inferior durante 4 h. Los filtros se fijaron en formalina al 4 %, a continuación los núcleos se tiñeron con DAPI y se visualizaron. Como control negativo (-/-) se usó medio sin suero. Las células se volvieron a incubar con toxina Pertussis (PTX) durante 30 mins antes del ensayo de quimiotaxis. Los gráficos de barras de la Figura 11 muestran el Índice de Migración promedio + ETM para cada grupo de tratamiento. Cada barra representa al menos pocillos por triplicado y al menos 3 fotografías tomadas por tratamiento. $p < 0,001$ ***; $p < 0,01$ ** ; $p < 0,05$ * con respecto a pocillos tratados con SFM a menos que se indique de otro modo.

Los resultados de la Figura 11 muestran que la coadministración de C17m con C140 no parecía que influyera en la migración de macrófagos a C140.

60 **Quemerina15-ratón y Quemerina17-ratón suprimen la secreción de TNF α mediante macrófagos de murino estimulados con Zimosán**

Los PM θ se cultivaron en diversas condiciones: Sin tratar; Zimosán durante 15 h; tratamiento previo con Quemerina (1 pM) durante 1 h + Zimosán durante 15 h. Los gráficos de barras muestran la expresión media de TNF α tal como se determina mediante ELISA \pm ETM. Los experimentos se realizaron con determinaciones por triplicado para cada tratamiento. Los datos representativos para tres experimentos independientes que usar células de diferentes donantes se muestran en la Figura 12. $p < 0,001$ ***; $p < 0,01$ ** con respecto a nuestras tratadas con Zimosán. Dexa se refiere a dexametasona (1 mM), nd se refiere a por debajo del límite inferior de detección (0,25 ng/ml).

Como se puede observar, el tratamiento con C15m (1 pM) y C17m (1 pM) suprimía la expresión de TNF inducida con Zimosán (C15m; 21 %, C17m; 30 %). Por lo tanto C15m y C17m suprimen la activación de macrófagos inducidos tanto por bacteria (LPS) como por levadura (Zimosán A).

5 El análisis de damero demuestra que Quemerina140 y Quemerina15-ratón inducen quimiotaxis y no quimioquinesis de macrófagos

El análisis de damero permite la diferenciación entre quimiotaxis y quimioquinesis. La quimiotaxis está indicada por la migración hacia la concentración más elevada de agente quimioattractor en el pocillo inferior. La quimioquinesis se refiere a un aumento del movimiento celular no direccional y se produce independientemente del gradiente de concentración presente. El análisis de damero se realizó incubando previamente las células con C140 (10-500 pM) o C15m (10-1000 pM) y permitiendo que migraran hacia C140 (10-1000 pM) o C15m (10-1000 pM), respectivamente en el pocillo inferior para formar un damero de concentraciones.

De manera más específica, los PM θ se recuperaron después de una estimulación peritoneal de 4 días con perlas de BioGEL. Las cavidades peritoneales de los ratones C57B16/J macho se lavaron con 5 ml de PBS-EDTA 2 mM. Las células se centrifugaron y se volvieron a suspender en RPMI suplementado con BSA al 0,5 % y Hepes 25 mM. Las células ($0,5 \times 10^6$) se incubaron con C140 o C15m durante 30 mins antes del ensayo de quimiotaxis y a continuación se permitió que migraran hacia el agente quimioattractor en el pocillo inferior durante 4 h. Los filtros se fijaron en formalina al 4 %, a continuación los núcleos se tiñeron con DAPI y se visualizaron. Como control negativo (-/-) se usó un medio sin suero (SFM) y el RANTES de quimioquina CC se usó como control positivo (25 ng/ml). Los gráficos de barras de la Figura 13 muestran el Índice de Migración promedio + ETM para cada grupo de tratamiento. Cada barra representa al menos pocillos por triplicado y al menos 3 fotografías tomadas por tratamiento, $p < 0,001$ *** con respecto a los pocillos tratados con SFM.

Se encontró que C140 y C15m provocan una quimiotaxis real en lugar de quimioquinesis ya que la migración en el pocillo inferior de la cámara de Boyden solamente se producía cuando se ponía una concentración de agente quimioattractor más elevada en el mismo y no cuando se colocaba en el lado superior del filtro.

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

C15 induce fagocitosis por macrófagos de zimosán

Para reconocimiento *in vitro* de zimosán por macrófagos, las células de exudado peritoneal se aislaron mediante lavado con EDTA 2 mM enfriado el hielo en PBS a partir de ratones que se habían tratado por vía intraperitoneal 4 d antes con perlas de Biogel (2 % en p/v). Los macrófagos se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad de $2,5 \times 10^5$ células por pocillo en medio Optimem. Las células se lavaron tres veces con medio antes de la adición de zimosán etiquetado con isotiocianato de Fluoresceína (FITC) (Invitrogen) en ensayos de reconocimiento a proporciones de macrófago/partícula de 10:1 en presencia de Quemerina15 a cualquiera de 0,1 pM, 1 pM, 10 pM, 100 pM o 1 nM. vehículo = muestra de control sin Quemerina15. La absorción de zimosán etiquetado con FITC fue seguida por análisis de FACS y se expresa como un índice de reconocimiento relativo, es decir, la proporción del % de células que absorben zimosán x la proporción de la media geométrica de macrófagos tratados con C15/media geométrica de macrófagos tratados con vehículo.

Los resultados mostrados en la Figura 15 indican que la Quemerina15 induce la fagocitosis por macrófagos de zimosán. La inducción de fagocitosis por macrófagos más elevada se produce a una concentración de Quemerina15 de 10 pM. Estos resultados demuestran que los péptidos de quemerina pueden acelerar la reparación de vidas aumentando la fagocitosis por macrófagos de las células apoptóticas, residuos celulares, patógenos y productos patogénicos.

Discusión

Se sabe que múltiples mediadores coordinan los sucesos iniciales de la inflamación aguda. Por ejemplo, los eicosanoides obtenidos a partir de lípidos, citoquinas y quimioquinas regulan alteraciones vasculares y recuperación de células inflamatorias. Las citoquinas proinflamatorias, incluyendo TNF α e IL-1 γ activan rutas de señalización en células endoteliales, dando como resultado una regulación positiva de expresión de moléculas de adhesión, lo que facilita la captura de los leucocitos circulantes. Los resultados presentados anteriormente muestran que los péptidos C-terminales obtenidos a partir de la Quemerina140 son capaces de suprimir todos los componentes de la respuesta inflamatoria. Los resultados también muestran que los péptidos C-terminales obtenidos a partir de la Quemerina140 son capaces de reducir los niveles de quimioquinas y se podrían usar como una terapia para el shock endotóxico.

Todos los péptidos usados en este estudio se obtienen a partir de la Quemerina, y presentan una potencia increíblemente elevada (10^{-12} M) que asegura que estos mediadores se unen a los niveles de la quimiotaxina obtenida a partir de complemento, C5a des-arg (10^{-12} M), formil-Metionil-Leucil-Fenilalanina (fMLP; 10^{-11} M), leucotrieno B4 (LTB4; 10^{-11} M), TNF α (10^{-11} M), LPS (10^{-15} M) e IL-1 (10^{-14} M). El solicitante no conoce preparaciones farmacéuticas que hayan demostrado que presentan efectos fisiológicos a 10^{-11} M - 10^{-15} M. De hecho, la

dexametasona se administra comúnmente a concentraciones en el intervalo micromolar *in vitro* y consigue una regulación negativa de un 50 % de flujo de monocitos y neutrófilos en el modelo de peritonitis inducida por Zimosán a 30 µg/ratón (1,2 mg/kg). La Quemerina15-ratón regula de manera negativa la regulación de monocitos y neutrófilos hasta un alcance similar al de 30 µg de Dexametasona. La Quemerina15-ratón produce efectos antiinflamatorios equivalentes en este modelo de murino de inflamación con una dosis de solamente 8 µg por ratón (0,32 ng/kg).

Los ensayos de quimiotaxis secundaria permitieron es potencial quimiotáctico de los sobrenadantes de ensayos de activación de macrófagos a cuantificar, y el impacto de la supresión de quimioquina mediada por Quemerina en las propiedades quimiotácticas del medio a determinar. El análisis de estos resultados reveló una reducción de la migración de macrófagos hacia sobrenadantes de macrófagos tratados con Quemerina + LPS/IFN γ en comparación con LPS/IFN γ solo, lo que indica una supresión general de una amplia gama de agentes quimioattractores de macrófagos. Los ejemplos dados demuestran las propiedades quimioattractoras limitadas o no existentes de péptidos antiinflamatorios obtenidos a partir de Quemerina en comparación con C140.

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

Materiales y Métodos

Animales

Todos los estudios en animales se realizaron con la aprobación ética local y de acuerdo con los reglamentos de la UK Home Office (Guidance on the Operation of Animals, Scientific Procedures Act, 1986).

Anticuerpos y Reactivos

La Quemerina anti-humana, Quemerina AB anti-murino, hQuemerina 137 (secuencia ID no: 31, disponible en RandD como Glu21-Ser157 recombinante), mQuemerina 140 (Seq ID no: 34), Captura AB anti-mRANTES, Detección AB anti-mRANTES, mRANTES, mTNF α , Captura AB anti-mTNF α , Detección AB anti-mTNF α se adquirieron en R&D Systems. Los péptidos de Quemerina (C11m, C13m, C13h, C15m, C17m) se sintetizaron mediante biosíntesis (www.biosyn.com). Dexametasona, Lipopolisacárido (E. coli), Leupeptina se obtuvieron en Sigma Aldrich. El interferón gamma (IFN γ) se adquirió en Peprotech. Los comprimidos de OPD se obtuvieron en Dakocytomata, tampón de dilución de Estreptavidina-HRP y EstrepAv-HRP se adquirieron en Endogen. El kit 6 plex de Luminex (IL-12 p40, IL-1 β , IL-6, MCP-1, TNF α , IL-10) fue proporcionado por Bio-rad y se analizó usando un bioanalizador Bio-rad y software X.

Inhibición de la Activación de Macrófagos – Ensayo de Activación de Macrófagos

Se inyectó 1 ml de perlas de poliacrilamida de BioGEL al 2 % en Solución Salina Tamponada con Fosfato estéril (PBS) por vía intraperitoneal (ip) en ratones C57B1/6J. Cuatro días después de la administración de BioGEL por ip, Los ratones se sacrificaron con el método de CO $_2$ de acuerdo con las directrices de Home Office. Las cavidades peritoneales se lavaron abundantemente con 10 ml de PBS-EDTA 2 mM estéril para recoger infiltrado celular evocado/obtenido con BioGEL. Las suspensiones de células recogidas se centrifugaron a 1000 x g durante 5 mins a 4 °C. Los sobrenadantes se descartaron en los sedimentos celulares se volvieron a suspender en 6 ml de medio OptiMEM suplementado con Glutamina 2 mM, 50 unidades/ml de Penicilina y 50 µg/ml de Estreptomina. Los macrófagos se cuantificaron después de incubación en hielo durante 5-10 mins con solución de Turk usando un hemocitómetro. Las suspensiones celulares (2 ml; 1,5 x 10 6 /pocillo) se sembraron en placas de cultivo tisular de seis pocillos (35 mm de diámetro: Costar, Reino Unido) y se permitió que se adhirieran durante 2 horas a 37 °C en una atmósfera mitificada que contenía CO $_2$ al 5 % para aislar las poblaciones de macrófagos mediante adherencia. Esto proporcionó una pureza superior para un 95 % evaluada mediante citocentrifugación, tinción de células con Azul de Metileno y Eosina y recuento basándose en la morfología celular. Las células no adherentes (principalmente granulocitos) se descartaron y los pocillos se lavaron tres veces con PBS estéril para retirar las células poco adherentes o muertas. Para evaluar la supresión potencial de la activación de macrófagos y por lo tanto una reducción de la expresión de mediadores pro-inflamatorios, se incubaron previamente macrófagos (1,5 x 10 6 células/pocillo) con péptidos de Quemerina (C11m, C13m, C15m, C17m; 10 $^{-12}$ - 10 $^{-8}$ M) o control positivo (Dexametasona; 1 µM) durante 1 h y a continuación se estimularon con LPS (100 ng/ml) e IFN γ (20 ng/ml) durante 15 h. Para determinar la sensibilidad a PTX y la dependencia después de proteólisis, las células se incubaron previamente con PTX (200 ng/ml) o Leupeptina (15 µg/ml). Las células adicionales se trataron con péptidos solos. Los sobrenadantes se recogieron y se almacenaron a -20 °C hasta su uso en Ensayos de Inmunoabsorción Ligada a Enzimas (ELISA) y ensayos de Luminex. Las células se lisaron para permitir la extracción del ARN total con el método de TRIZOL. Los lisados se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ARN siguiendo las directrices del fabricante (Qiagen, Kit Mini Prep RNeasy).

Detección de proteína secretada mediante los ELISA y Luminex

Se evaluaron RANTES, Factor de necrosis tumoral (TNF α) y concentraciones de CCL9 en sobrenadantes de células

Mediante ELISA. Los niveles de IL-12 p40, IL-10, IL-1 β , TNF α , MCP-1 (proteína 1 quimioattractora de monocitos) e IL-6 se determinaron mediante ensayo de perlas multiplexadas Luminex (ensayo 6 plex de Bio-rad). Los límites inferiores de detección para los ELISAs fueron 0,1-0,5 ng/ml y 10-50 pg/ml para ensayos de Luminex.

5 Preparación de ARN y RT-PCR

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

10

Ensayo de Quimiotaxis

La migración celular se evaluó mediante el uso de membranas transpocillo (ChemoTX, 6 mm de diámetro, 8 μ m de tamaño de poro). En resumen, las células obtenidas en BioGEL se recogieron y se colocaron en membranas transpocillo (250 000 células/membrana en RPMI suplementado con Hepes 25 mM y albúmina de suero bovino al 0,1 %. Se permitió que las células migraran hacia péptidos de Quemerina (1 pM - 100 nM) durante 4 h. La transducción de señales a través de receptores acoplados a proteína G se bloqueó mediante incubación previa de las células con toxina Pertussis (PTX, 200 ng/ml, Sigma-Aldrich) durante 30 mins antes de colocar las células en membranas transpocillo. Las células migradas en el lado inferior de las membranas se fijó (formaldehído al 3 %) y se tiñeron con DAPI. La migración se cuantificó como recuento de píxeles totales de núcleos teñidos con DAPI bajo el microscopio confocal (2 fotos/membrana y un mínimo de 3 pocillos replicados por tratamiento). Las imágenes se analizaron usando el software Metamorph Offline para determinar el porcentaje de áreas umbral (TA) ocupadas por células migradas. Los índices de migración se obtuvieron dividiendo el TA de tratamiento entre el TA de medio sin suero. Para ensayos de quimiotaxis secundaria se usaron membranas ChemoTx de 3 mm de diámetro, 8 μ m de poro con 50 000 células/membrana.

15

20

25

Peritonitis de murino

A los ratones C57BL6/J se les administraron 500 μ l de Quemerina15-ratón (0,32 ng/kg) o vehículos solo (PBS estéril) por i.p. 1 h antes de la administración de 500 μ l y 10 μ g de Zimosán A por i.p. Después de 4 h y sacrificio humano, los exudados peritoneales se recogieron mediante lavado peritoneal con 5 ml de PBS-EDTA 3 mM estéril. El fluido de lavado sin células se obtuvo para uso en los ELISA y se prepararon células de exudado para análisis que se describen a continuación.

30

35 Recuentos leucocitarios diferenciales y análisis de FACS

A los ratones C57BL6/J se les administraron 500 μ l de Quemerina15 (0,32 ng/kg) o vehículo (PBS) por i.p. 1 h antes de la administración de 500 μ l y 10 μ g de Zimosán A por i.p. Después de 2 h, 4 h, 8 h, 16 h, 24 h y 48 h y sacrificio humano. Las alícuotas de células de lavado se prepararon para determinación de recuentos leucocitarios total y diferencial. Para la determinación de la composición celular (células PMN con respecto a mononucleares), las células se bloquearon con 2.42G Fc μ ll/III anti-ratón (0,5 μ g/0,1 x 10⁶ células) durante 10 min y se tiñeron (10 min) con 7/4 anti-ratón conjugado con FITC y Ly-6G anti-ratón conjugado con PE (0,5 μ g/0,5 x 10⁶ células; clones rmC5-3 y RB6-8C5, respectivamente de BD Pharmingen). Las células se analizaron en un citómetro de flujo FACSCalibur con el software CellQuest. Para cada muestra, se adquirieron un mínimo de 10.000 sucesos. Se construyeron ventanas alrededor de tres poblaciones, los neutrófilos(7/4^{high}, Ly-6G^{high}), monocitos (7/4^{high}, Ly-6G^{low}) y macrófagos residentes (7/4^{low}, Ly-6G^{low}). El porcentaje de sucesos totales en cada población se midió. Además, el fluido de lavado sin células se recogió para uso en ensayos ELISA y Luminex.

40

45

Estadísticas

Los ensayos t de Student y ANOVA de una vía se realizaron usando el software GraphPad Prism.

50

Listado de secuencias

<110> ISIS innovation Limited

<120> Tratamiento de Inflamación y/o Shock Endotóxico

<130> JA37756P.WOP

<160> 45

<170> PatentIn versión 3.3

<210>1

<211>11

55

60

65

ES 2 663 379 T3

<212>PRT
<213> *Mus* sp.

<400> 1

5

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

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

10

<400> 2

15

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

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

20

<400> 3

25

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

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

30

<400> 4

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

35

<210> 5
<211> 16
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

40

<400> 5

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

45

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

50

<400> 6

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

Ser

55

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

ES 2 663 379 T3

<400> 7

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

<210> 8
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

10 <400> 8

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

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

20 <400> 9

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

<210> 10
<211> 13
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

30 <400> 10

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

<210> 11
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

40 <400> 11

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

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

50 <400> 12

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

<210> 13
<211> 14
<212> PRT
<213> *Mus* sp.

<400> 13

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

ES 2 663 379 T3

<210> 14
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*
 5
 <400> 14
 Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 10
 <210> 15
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Mus sp.*
 15
 <400> 15
 Gly Glu Asp Pro His Gly Tyr Phe Leu Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 20
 <210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25
 <400> 16
 Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala
 1 5 10
 30
 <210> 17
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35
 <400> 17
 Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe
 1 5 10
 40
 <210> 18
 <211> IB
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45
 <400> 18
 Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10
 50
 <210> 19
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 55
 <400> 19
 Ala Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala
 1 5 10 15
 <210> 20
 <211> 16
 <212> PRT

ES 2 663 379 T3

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

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

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<400> 21

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

Ser

15

<210> 22

<211> 12

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<400> 22

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

25

<210> 23

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

30

<400> 23

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

35

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 24

40

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

45

<210> 25

<211> 13

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 25

50

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

55

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 663 379 T3

<400> 26
 Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe
 1 5 10
 5 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 27
 10 Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe
 1 5 10 15
 <210> 28
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 28
 20 Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10
 <210> 29
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 25 <400> 29
 30 Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 <210> 30
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 35 <400> 30
 40 Gly Glu Asp Pro His Ser Phe Tyr Phe Pro Gly Gln Phe Ala Phe Ser
 1 5 10 15
 <210> 31
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 31

ES 2 663 379 T3

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

<210> 32
 <211> 143
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 32

Glu Leu Thr Glu Ala Gln Arg Arg Gly Leu Gln Val Ala Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Trp Ala Phe Gln Glu Thr Ser Val
 20 25 30

10

ES 2 663 379 T3

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

<210> 33
 <211> 163
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 33

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

10

ES 2 663 379 T3

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

Pro Arg Ser

5 <210> 34
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> *MUS* sp.

<400> 34

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

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

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

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

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

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

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

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

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

15 <210> 35
 <211> 146
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.

<400> 35

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

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

ES 2 663 379 T3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Lys
 145

<210> 36
 <211> 162
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.
 <400> 36

5

Met Lys Cys Leu Leu Ile Ser Leu Ala Leu Trp Leu Gly Thr Arg Gly
 1 5 10 15

Thr Val Gly Thr Glu Pro Glu Leu Ser Glu Thr Gln Arg Arg Ser Leu
 20 25 30

Gln Val Ala Leu Glu Glu Phe His Lys His Pro Pro Val Gln Leu Ala
 35 40 45

Phe Gln Glu Ile Gly Val Asp Arg Ala Glu Glu Val Leu Phe Ser Ala
 50 55 60

Gly Thr Phe Val Arg Leu Glu Phe Lys Leu Gln Gln Thr Asn Cys Pro
 65 70 75 80

Lys Lys Asp Trp Lys Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg
 85 90 95

Arg Arg Lys Cys Leu Ala Cys Ile Lys Met Asp Pro Lys Gly Lys Ile
 100 105 110

10

ES 2 663 379 T3

Leu Gly Arg Ile Val His Cys Pro Ile Leu Lys Gln Gly Pro Gln Asp
 115 120 125

Pro Gln Glu Leu Gln Cys Ile Lys Ile Ala Gln Ala Gly Glu Asp Pro
 130 135 140

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

Thr Lys

5 <210> 37
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> *Mus* sp.
 <400> 37

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

10 Ala Phe Ser

<210> 38
 <211> 19
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 38

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

20 Ala Phe Ser

<210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial
 25 <220>
 <223> C15 Codificado

30 <400> 39

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

<210> 40
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> C15 Mutante

40 <400> 40

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

ES 2 663 379 T3

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
<213> *Mus* sp.
5
<400> 41

Arg Ala Leu Arg Thr Lys
1 5

10
<210> 42
<211> 8
<212> PRT
<213> *Mus* sp.
15
<400> 42

Phe Ser Arg Ala Leu Arg Thr Lys
1 5

20
<210> 43
<211> 13
<212> PRT
<213> Artificial
25
<220>
<223> C13h modificado
<400> 43

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

30
<210> 44
<211> 19
<212> PRT
<213> *Mus* sp.
35
<400> 44

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

Phe His Lys

40
<210> 45
<211> 20
<212> PRT
<213> *Mus* sp.
45
<400> 45

Lys Pro Glu Cys Thr Ile Lys Pro Asn Gly Arg Arg Arg Lys Cys Leu
1 5 10 15
Ala Cys Ile Lys
20

REIVINDICACIONES

1. Uso de uno o más péptidos que consiste en hasta 30 aminoácidos en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, o en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, y en el que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de shock endotóxico, y/o para el tratamiento de una herida y/o para el tratamiento de inflamación.
2. El uso de la reivindicación 1 en la que el uno o más péptidos tiene hasta 25 aminoácidos.
3. El uso de la reivindicación 1 en la que el uno o más péptidos tiene hasta 20 aminoácidos.
4. El uso de cualquier reivindicación precedente en la que la inflamación se trata reduciendo el nivel de uno o más mediadores inflamatorios.
5. El uso de la reivindicación 4 en la que el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre el grupo que consiste en TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-2 (CCL8), GRO α (CXCL1), GRO β (CXCL2), IL-8 (CXCL8), TECK (CCL25), MCP-1 (CCL2), interferón γ y Rantes (CCL5).
6. El uso de cualquier reivindicación precedente en la que el medicamento es para un uso terapéutico y/o profiláctico.
7. El uso de cualquier reivindicación precedente en la que uno o más de los péptidos consiste en la secuencia de Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38.
8. El uso de cualquier reivindicación precedente en la que el péptido está destinado para administración a una dosis entre aproximadamente 10 pg/kg y aproximadamente 1 mg/kg.
9. Un apósito o vendaje para heridas impregnado con uno o más péptidos que consiste en hasta 30 aminoácidos en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, o en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, y en el que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados.
10. El apósito o vendaje para heridas de la reivindicación 9 en la que el uno o más péptidos tiene hasta 25 aminoácidos.
11. El apósito o vendaje para heridas de la reivindicación 9 en la que el uno o más péptidos tiene hasta 20 aminoácidos.
12. El apósito o vendaje para heridas de la reivindicación 9, 10 u 11 en las que el uno o más péptidos consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38.
13. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico, y/o para el tratamiento de una herida, y/o para el tratamiento de inflamación, comprendiendo dicha composición farmacéutica uno o más péptidos que consisten en hasta 30 aminoácidos en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, o en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, y en el que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.
14. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 13 para uso en el tratamiento de inflamación reduciendo el nivel de uno o más mediadores inflamatorios.
15. La composición farmacéutica para uso de la reivindicación 14 en la que el uno o más mediadores inflamatorios se seleccionan entre el grupo que consiste en TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-12, G-CSF, MCP-2 (CCL8), GRO α (CXCL1), GRO β (CXCL2), IL-8 (CXCL8), TECK (CCL25), MCP-1 (CCL2), interferón γ y Rantes (CCL5).

16. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos seleccionados entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 o 30 y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 17. El péptido de la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, o 30.

10 18. Uno o más péptidos que consisten en hasta 30 aminoácidos en los que el uno o más péptidos comprenden una secuencia que tiene una identidad de secuencia de al menos un 80 % con respecto a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, o en el que el uno o más péptidos comprenden una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, y en el que el uno o más péptidos pueden estar acetilados, acilados, alquilados y glicosilados, para uso en el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico, y/o el tratamiento de una herida, y/o el tratamiento y/o prevención de inflamación.

15 19. Uno o más péptidos que consisten en una secuencia seleccionada entre el grupo que comprende la Seq ID No: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 37 y 38, para uso en el tratamiento y/o prevención de inflamación, y/o el tratamiento y/o prevención de shock endotóxico y/o el tratamiento de una herida.

20

Figura 1A

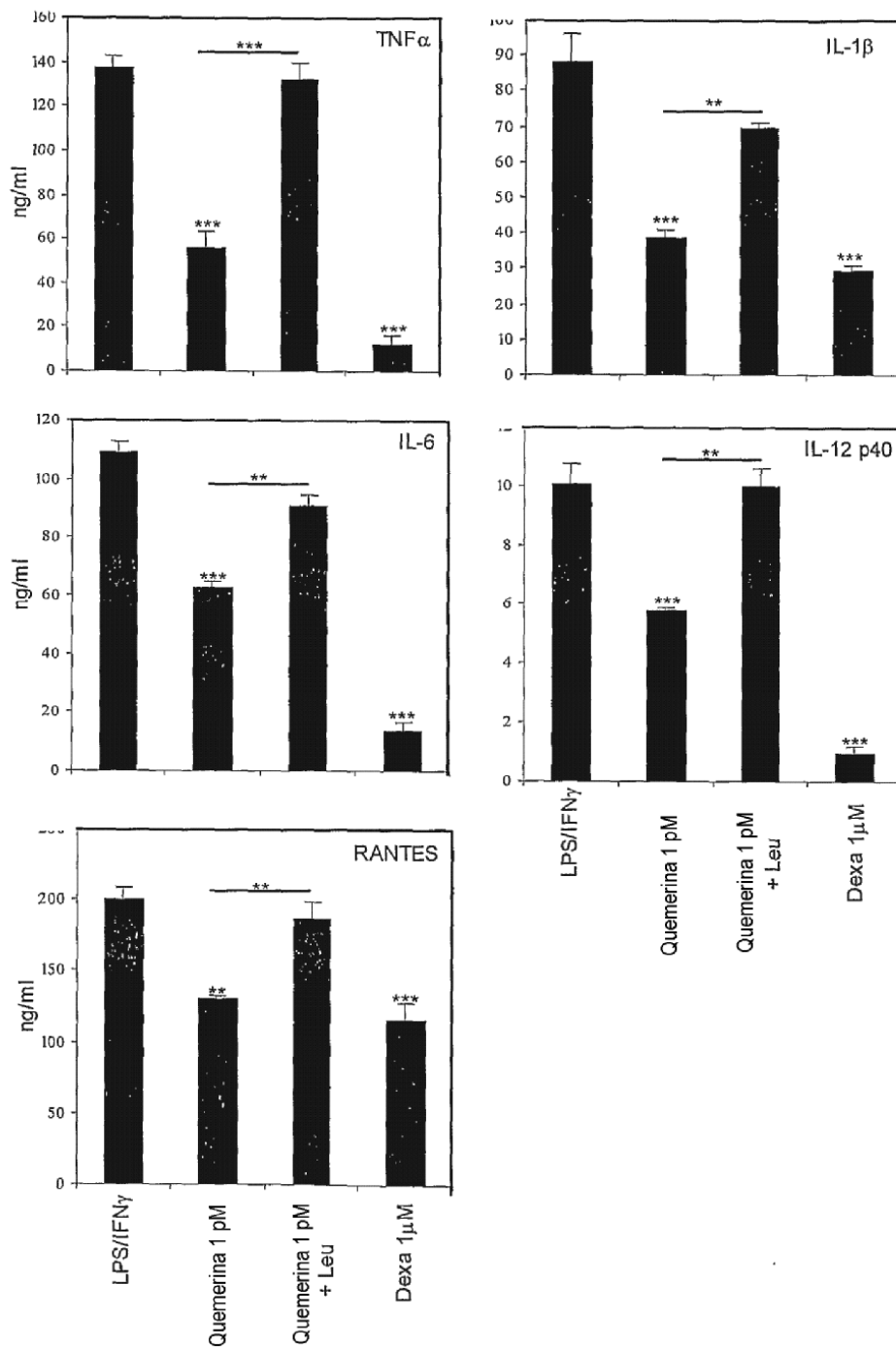


Figura 1B

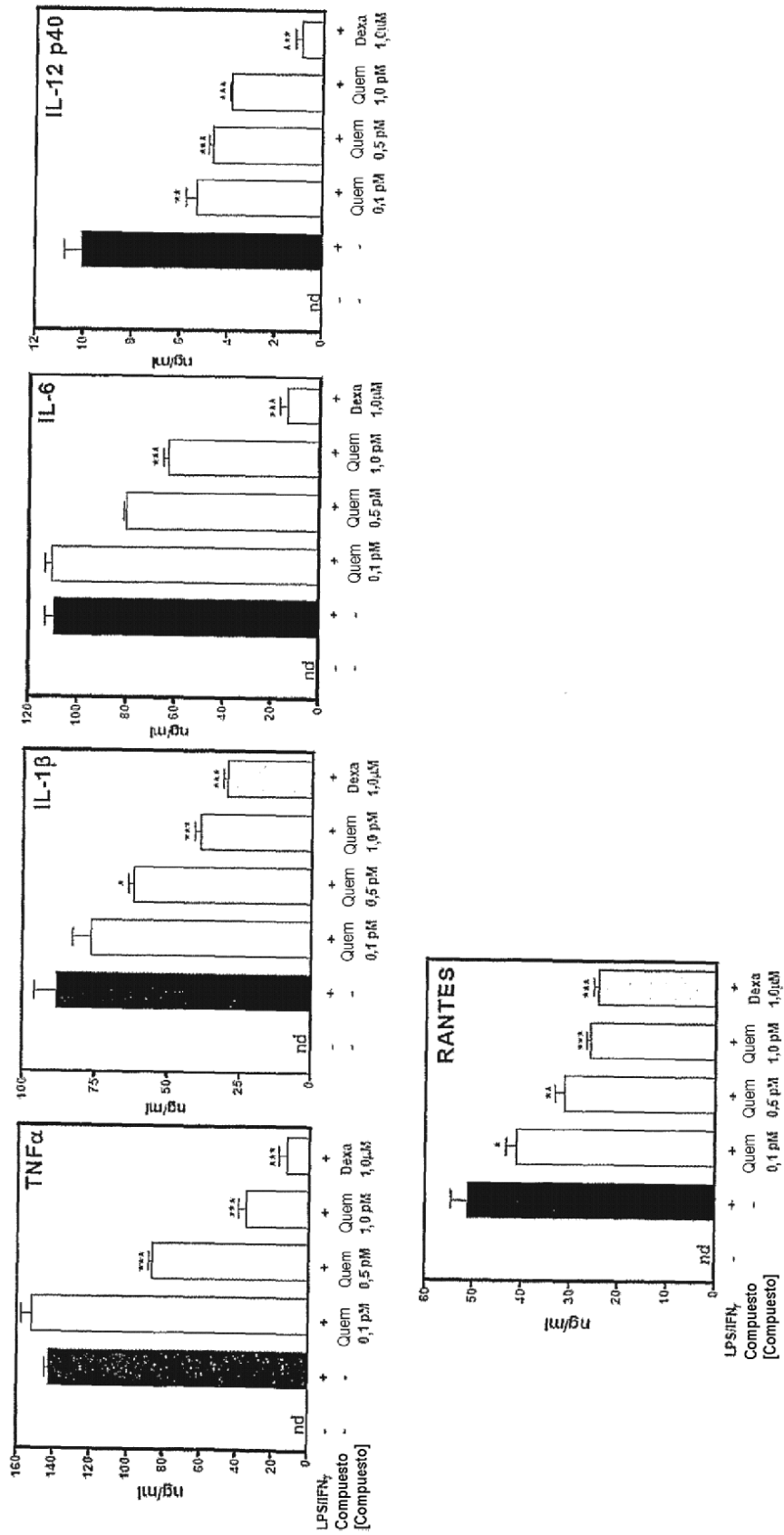


Figura 1C

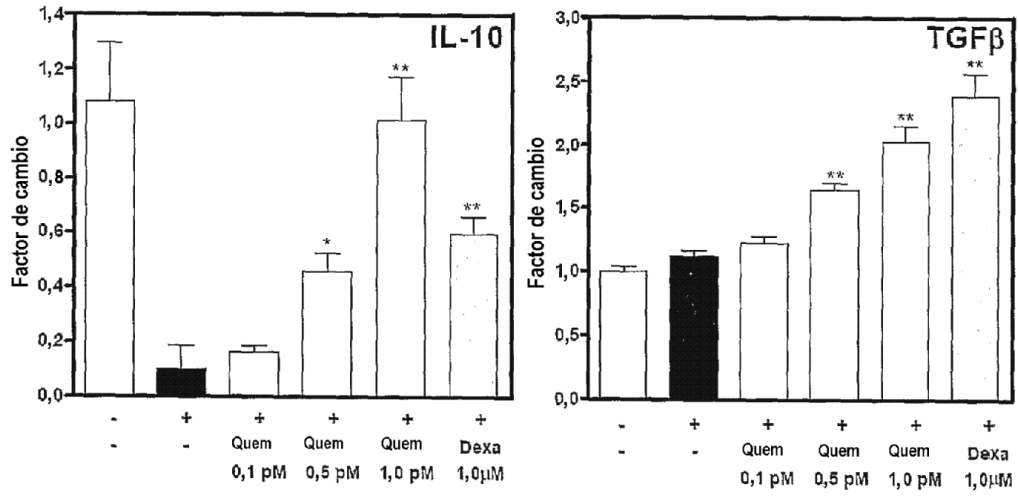


Figura 1D

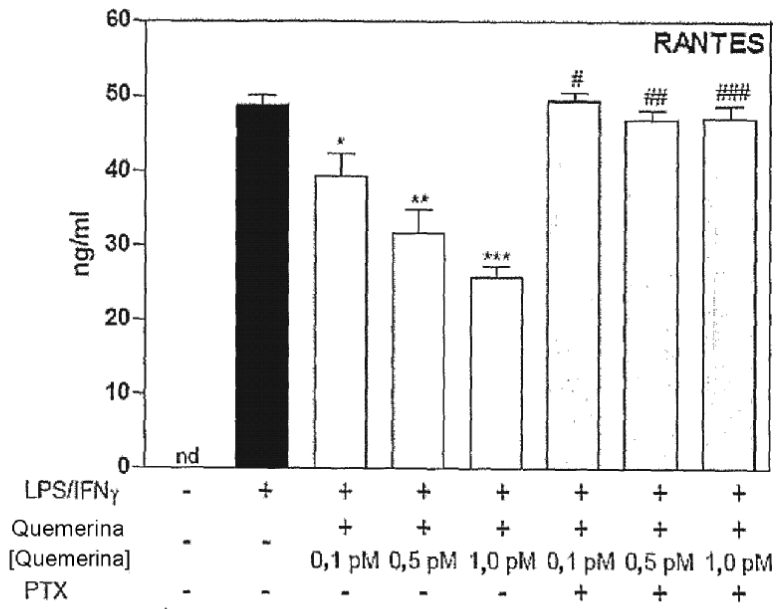


Figura 1E

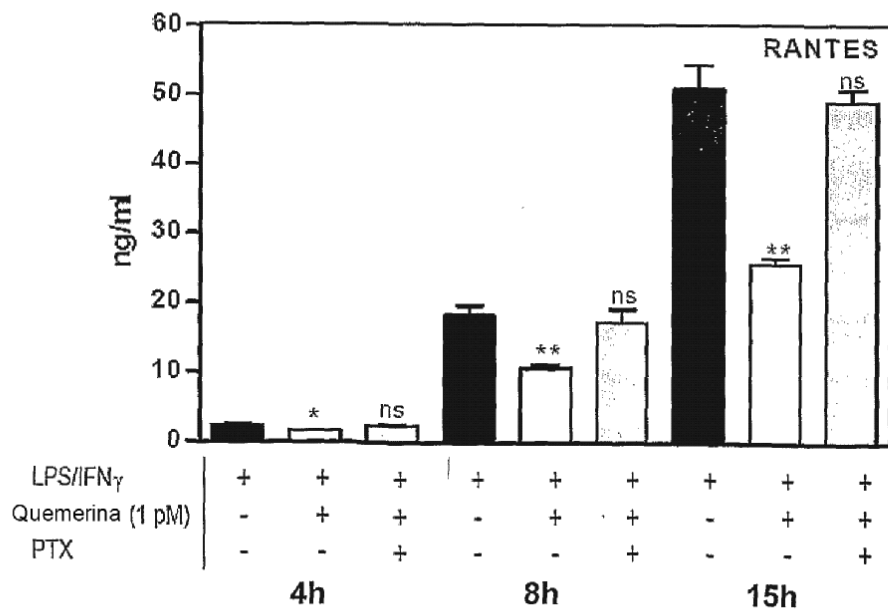
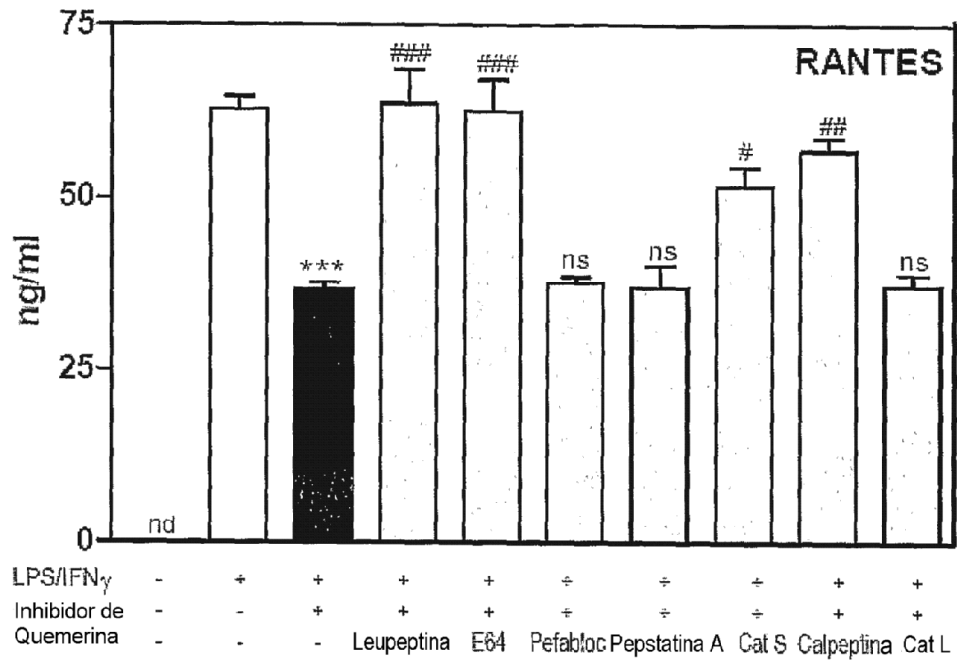


Figura 1F



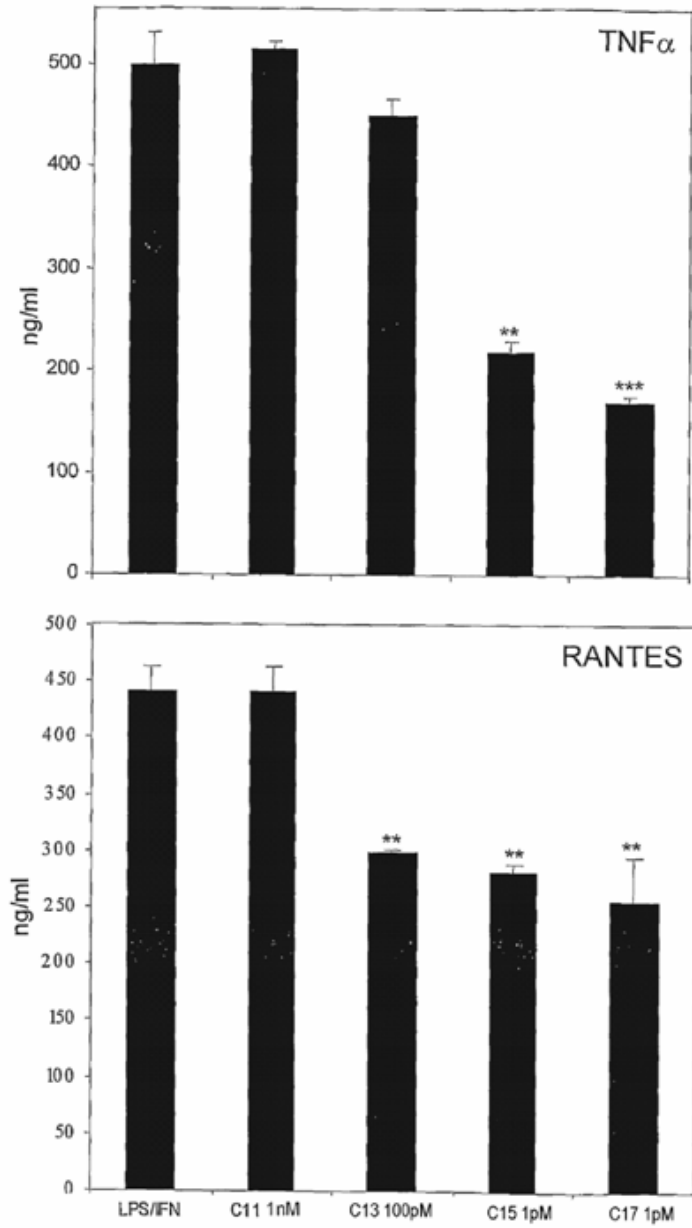


Figura 2B

Figura 3

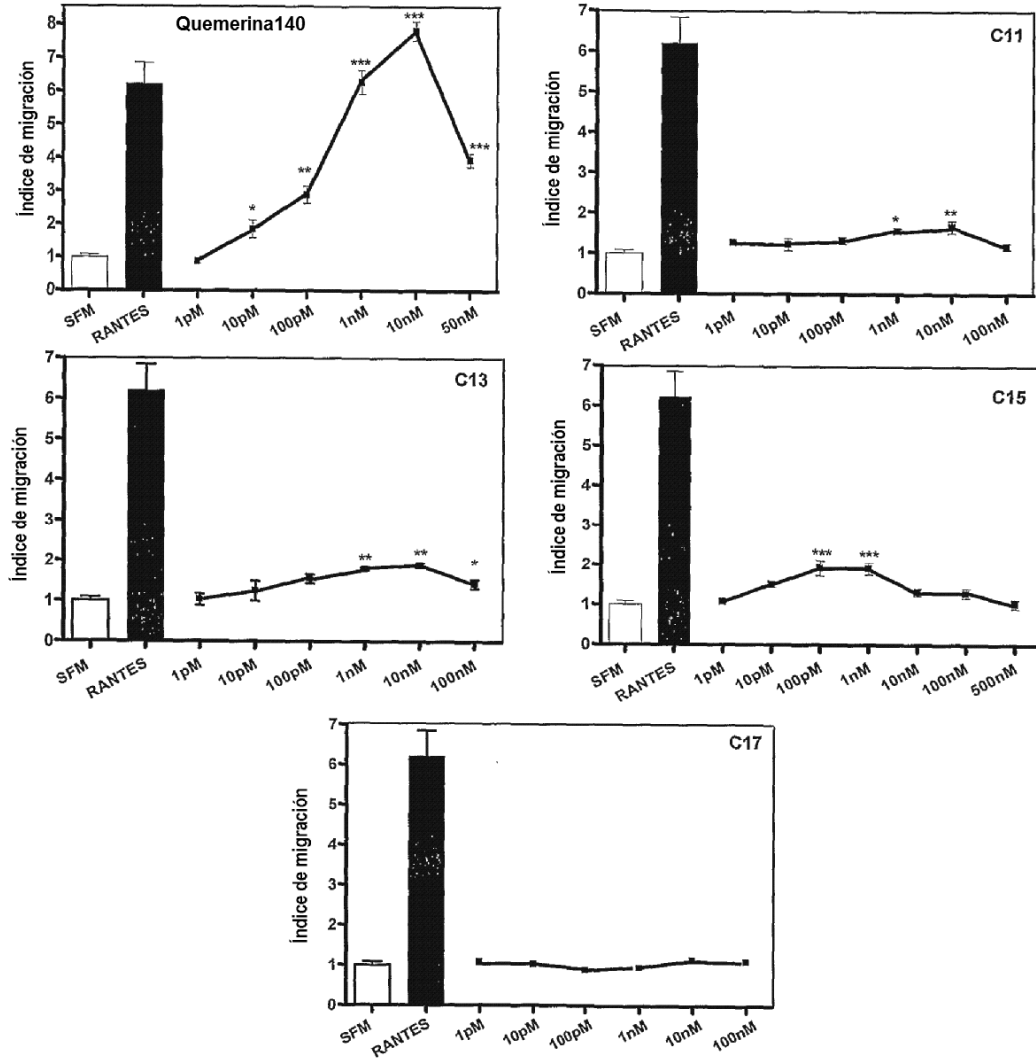


Figura 4

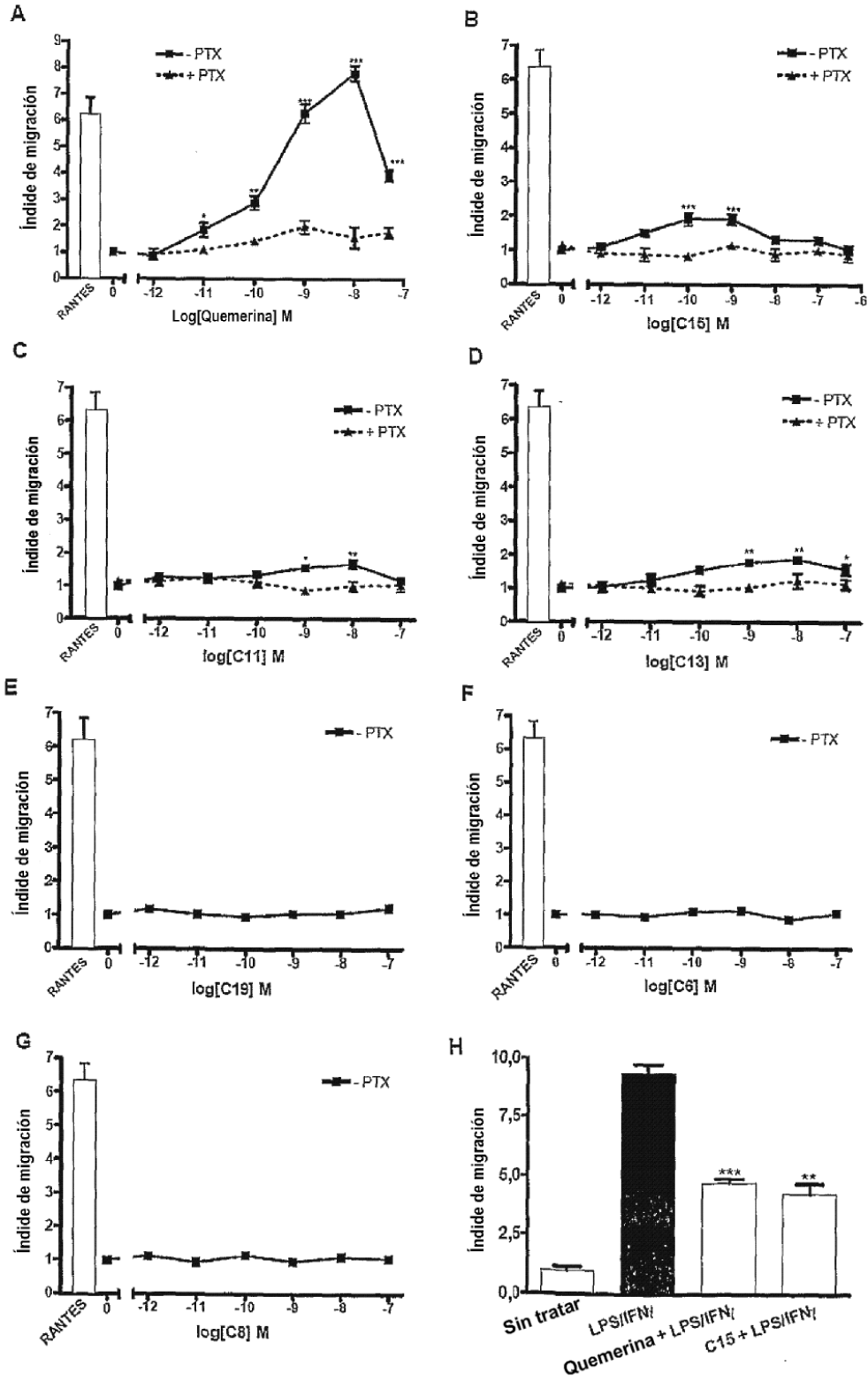


Figura 5

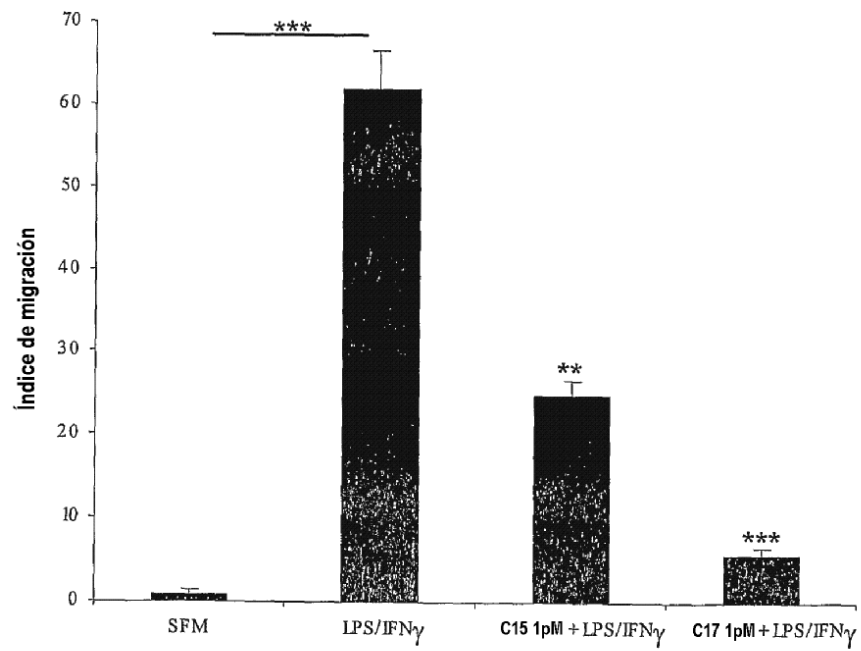
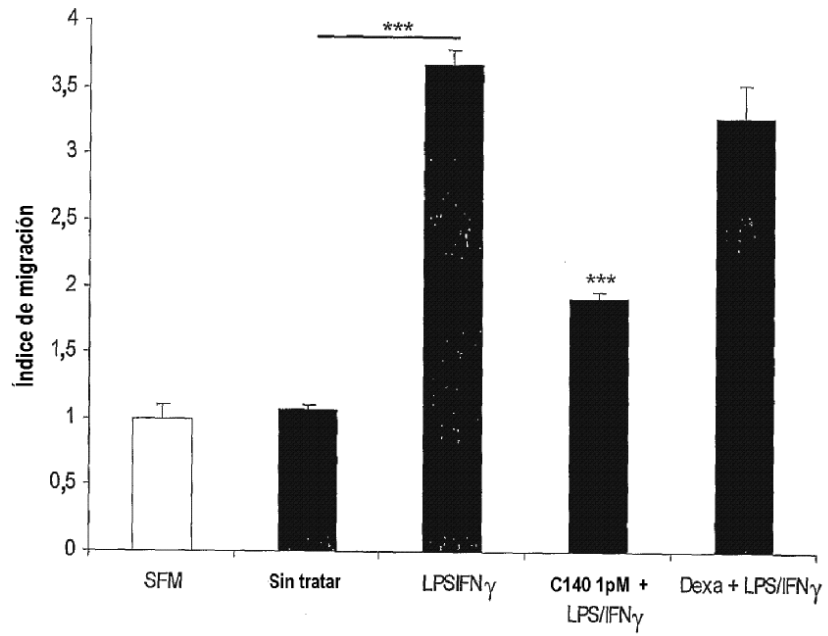


Figura 6

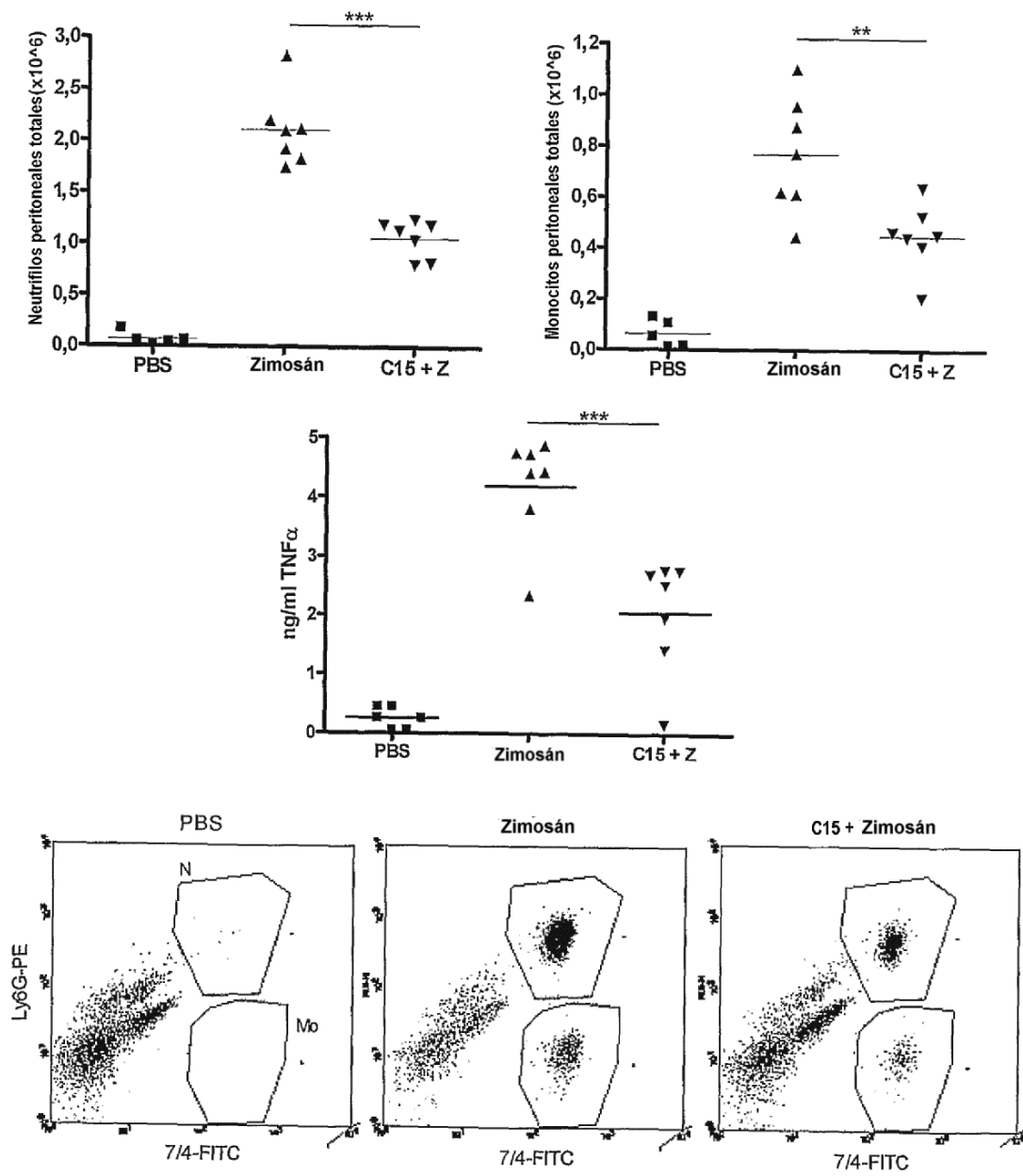


Figura 7

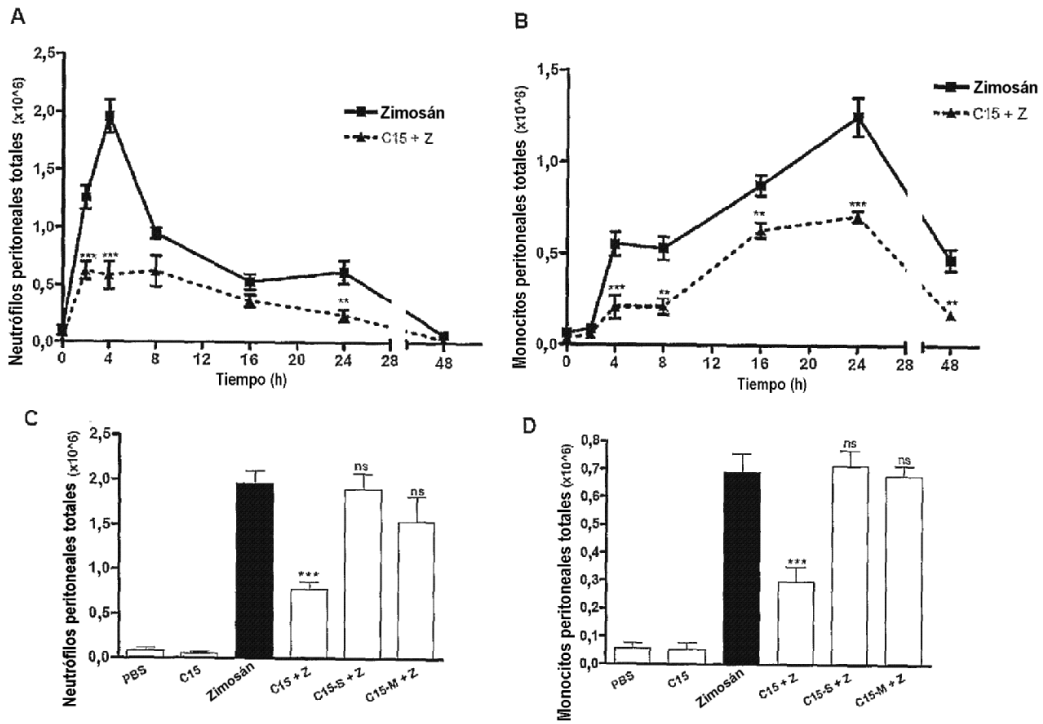
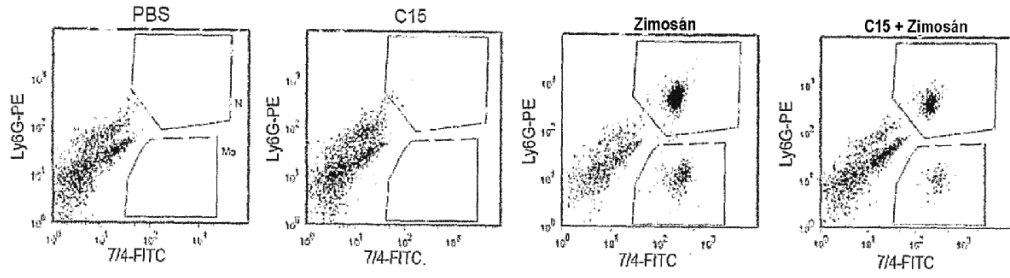


Figura 7 continuación...

E



F

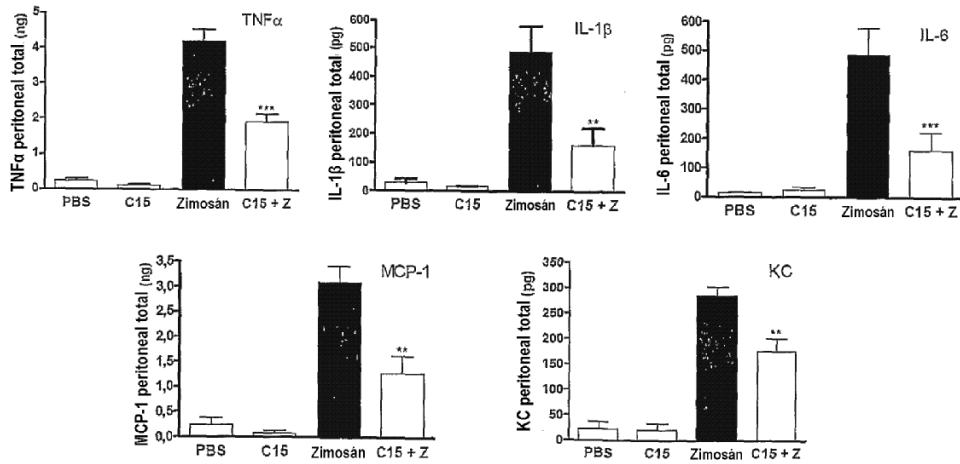


Figura 7 continuación...

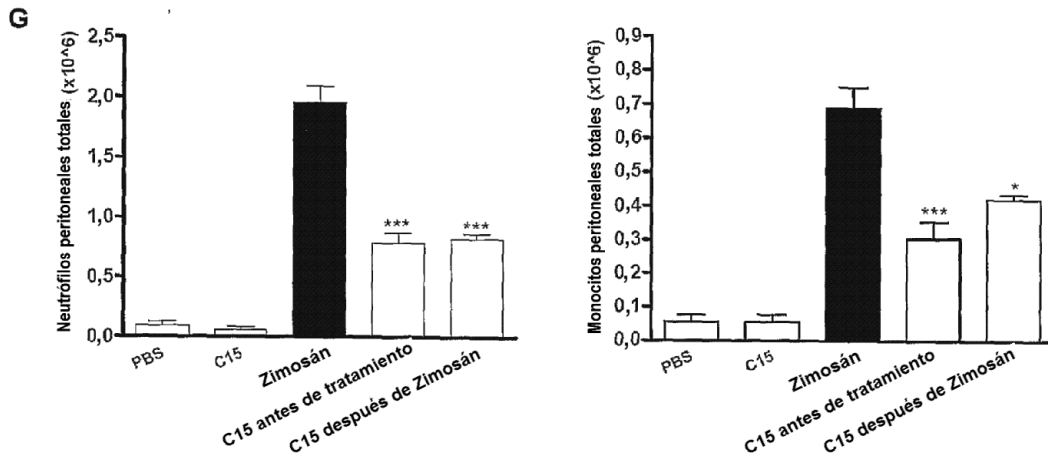
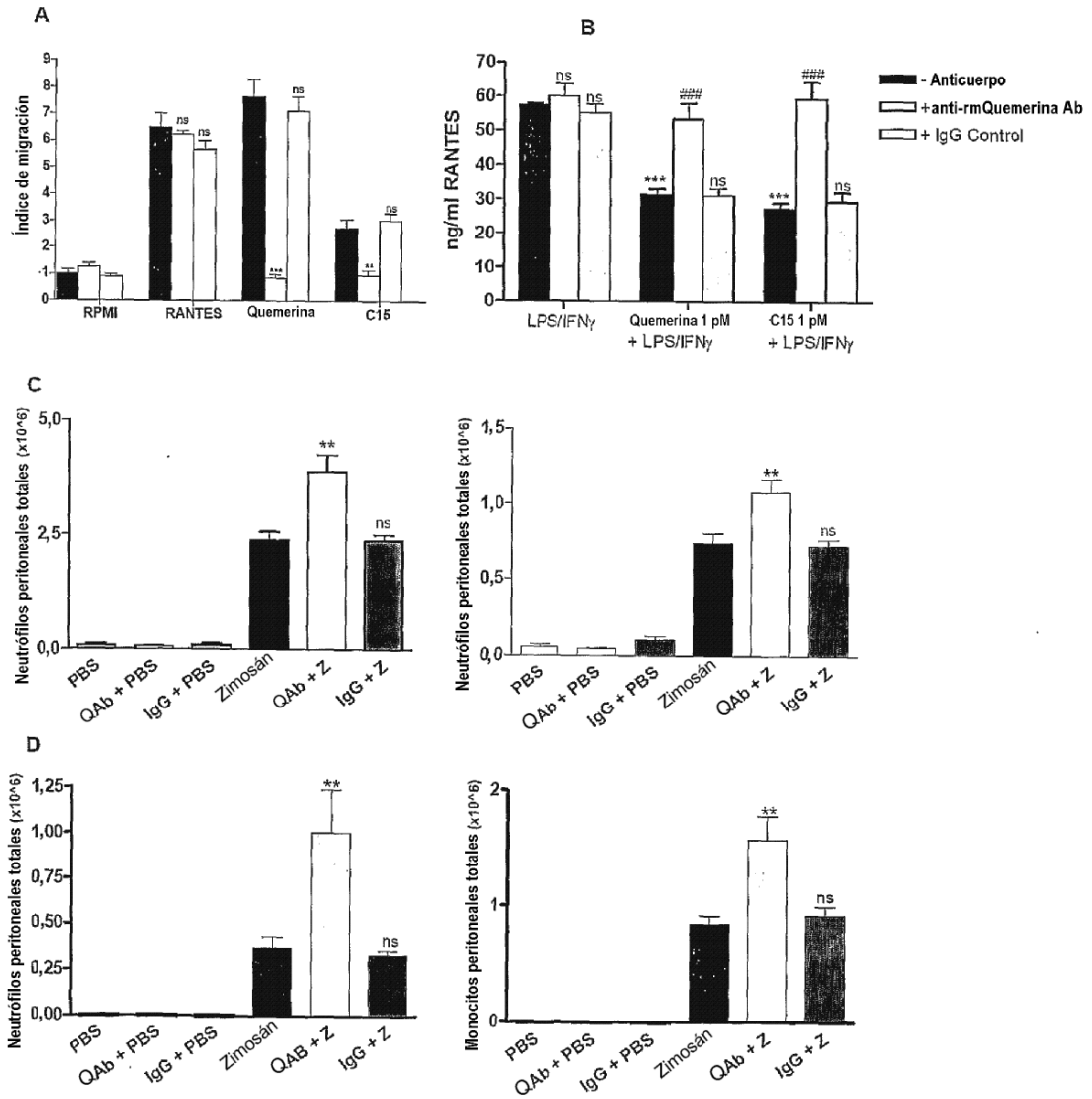


Figura 8



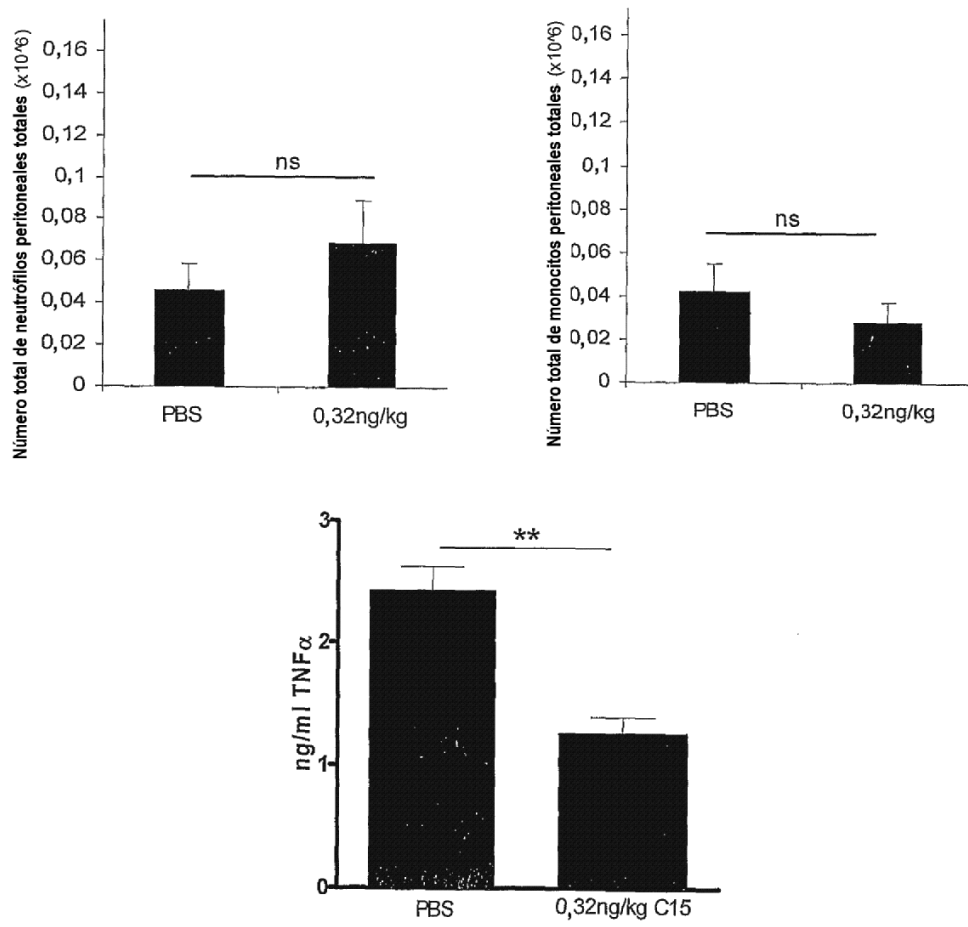


Figura 9

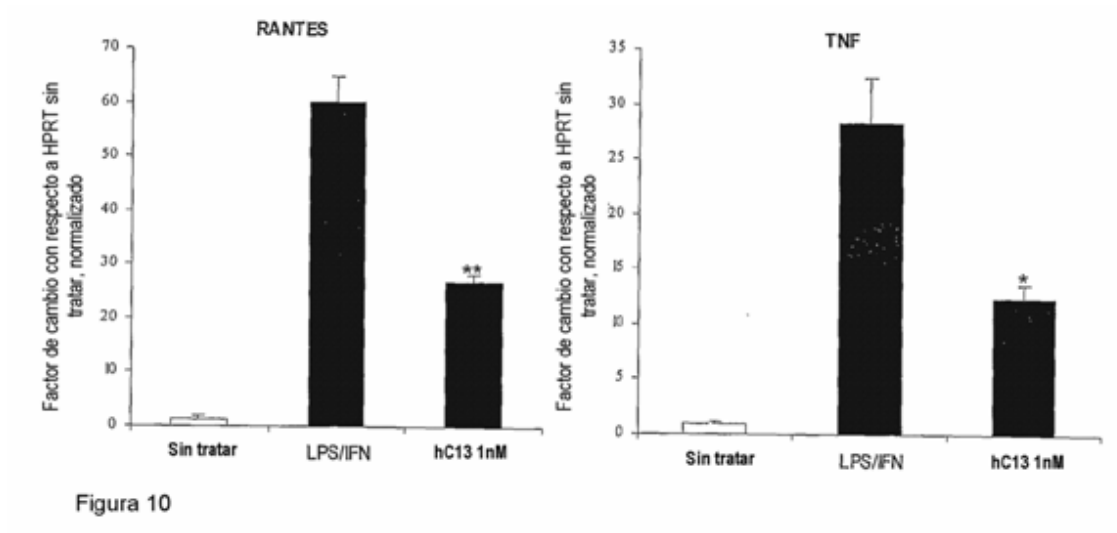


Figura 10

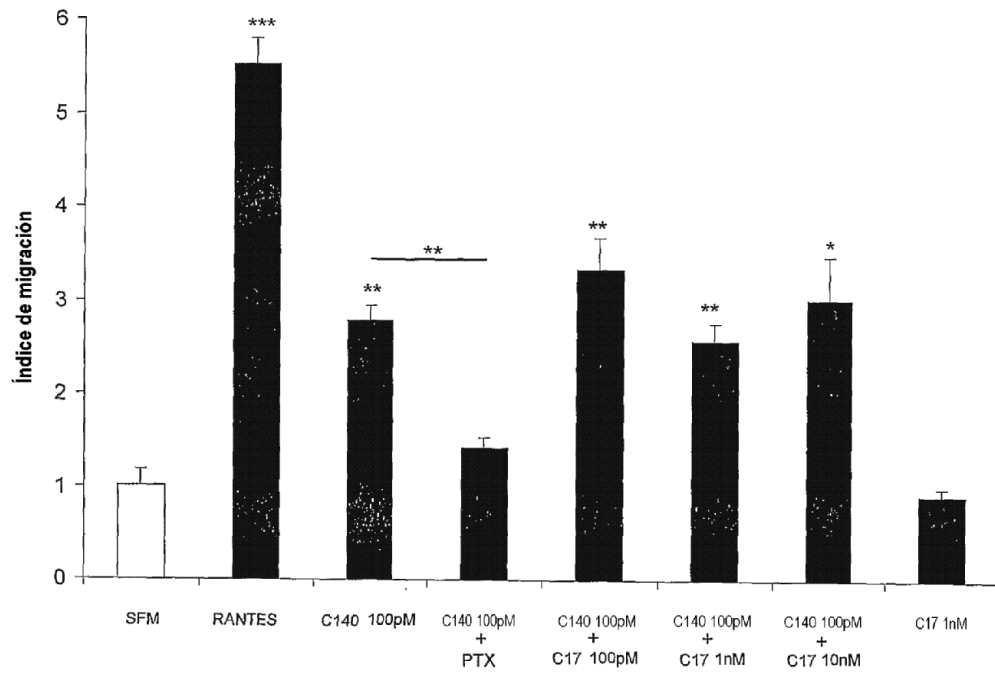


Figura 11

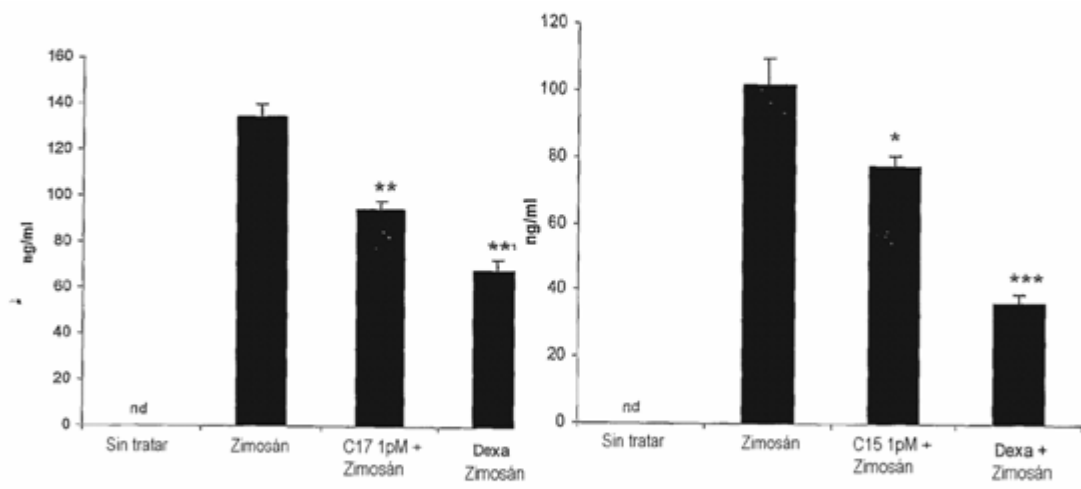


Figura 12

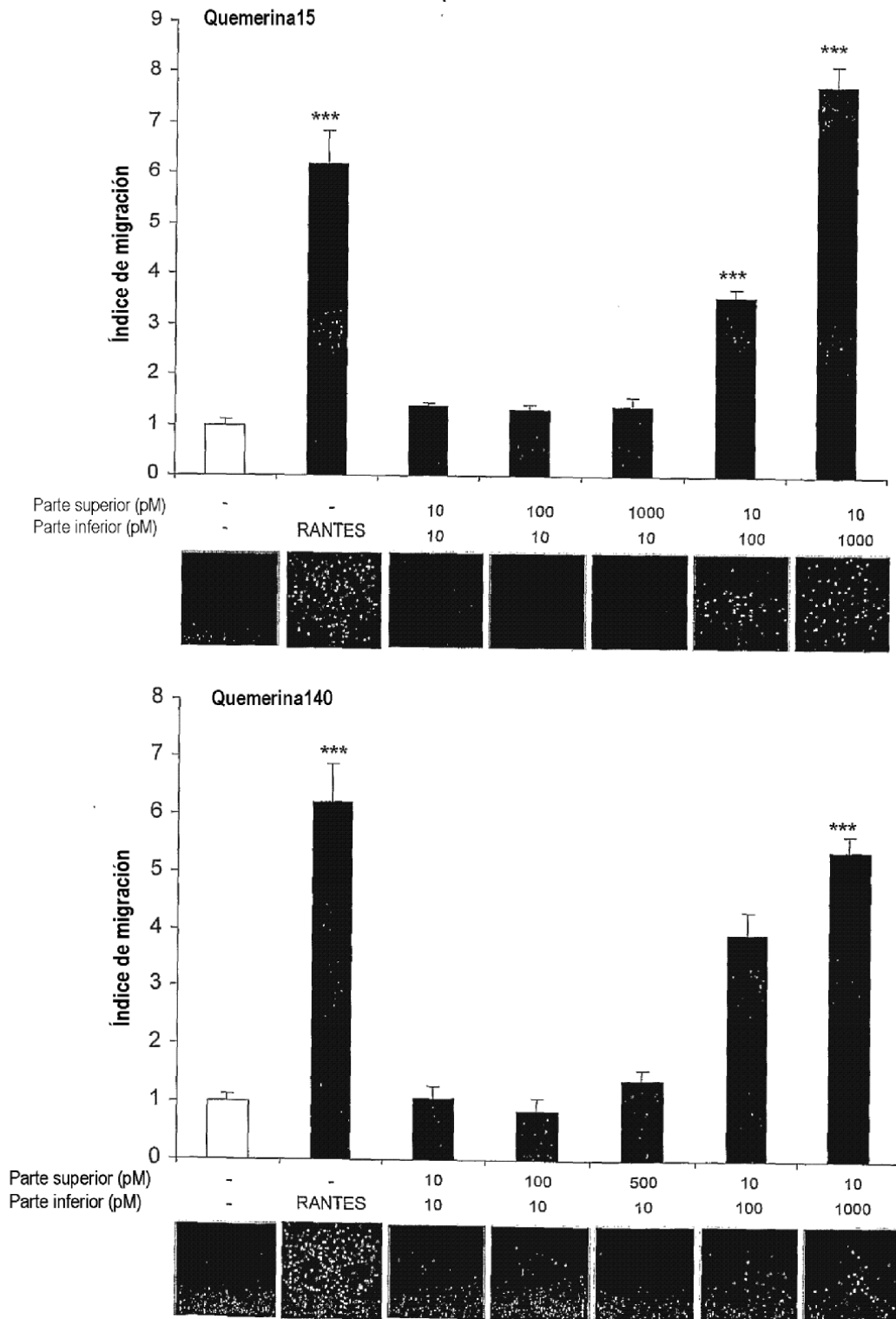


Figura 13

Figura 14

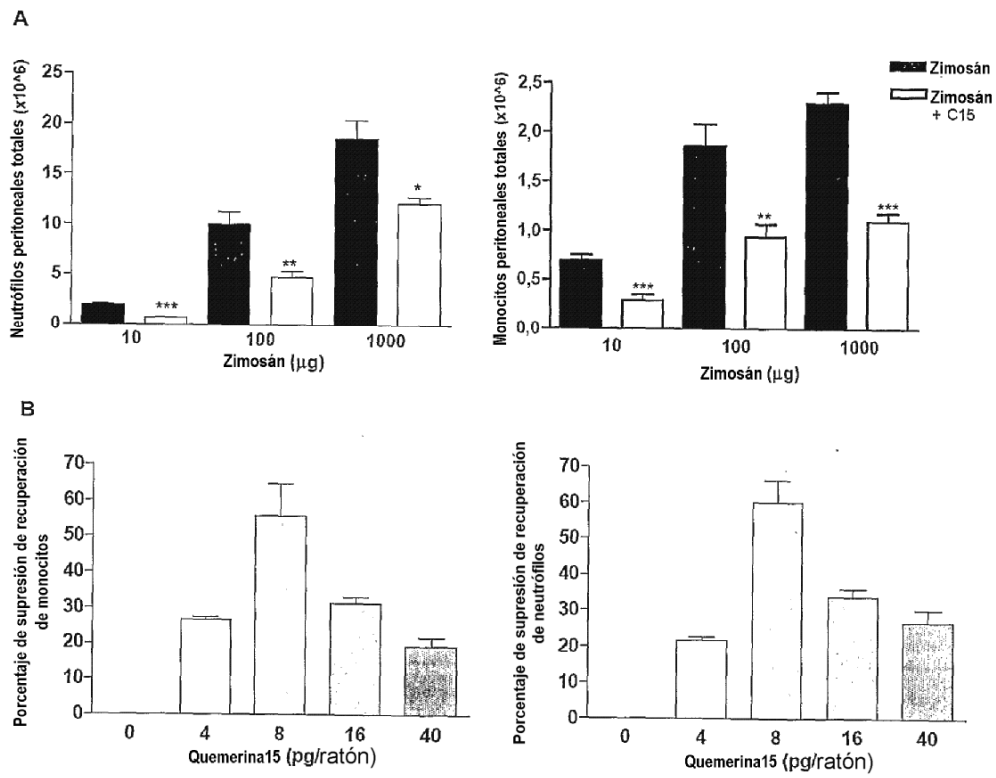


Figura 15

