

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 691 070**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2013 PCT/EP2013/055327**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013 WO13167298**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2013 E 13713371 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2850097**

54 Título: **Péptidos antiinflamatorios y composición que comprende los mismos**

30 Prioridad:

**11.05.2012 KR 20120050529
11.05.2012 KR 20120050533
02.07.2012 KR 20120071989
19.09.2012 KR 20120104144
19.09.2012 KR 20120104207**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.11.2018

73 Titular/es:

**KAEL-GEMVAX CO.,LTD (50.0%)
9F GemVax Tower 939 Unjung-dong Bundang-gu
Seongnam-si
Gyeonggi-do 463-440, KR y
KIM, SANG JAE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**KIM, SANG, JAE;
KIM, KYUNG, HEE;
LEE, KYU-YONG;
KOH, SEONG-HO;
PARK, HYUN-HEE;
HUH, SUNG, JIN;
LEE, WOO, JIN y
KIM, BUM, JOON**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 691 070 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos antiinflamatorios y composición que comprende los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos antiinflamatorios y composiciones que comprenden los mismos.

5 Antecedentes de la invención

La inflamación es un tipo de defensa biológica como medio de proteger el cuerpo del daño de tejidos biológicos que podría producirse por estímulos físicos externos, estímulos químicos tales como exposición a diversos alérgenos, o invasión de microorganismos incluyendo bacterias, hongos y virus.

10 La ruta de la ciclooxigenasa (COX) o la ruta de la lipooxigenasa (LOX) pueden utilizarse para la señalización de la inflamación, que produce prostaglandina, tromboxano, etc. Una vez que se libera la señal inflamatoria, uno de muchos cambios que se producen en el cuerpo es la expansión de los vasos sanguíneos para aumentar el suministro de sangre alrededor de la inflamación para concentrar células tales como los neutrófilos requeridos para la respuesta inflamatoria. Sin embargo, pueden aparecer enfermedades inflamatorias si se produce una respuesta de defensa biológica anómala excesiva. Para prevenir esto, están en desarrollo fármacos que suprimen la respuesta
15 inflamatoria excesiva reprimiendo las enzimas utilizadas en la ruta de señalización inflamatoria (por ejemplo, COX-1, COX-2, 5-LOX, 12-LOX etc.).

De acuerdo con una respuesta temporal, la inflamación se clasifica como inflamación aguda (respuesta inmediata, respuesta no específica, de algunos días a varias semanas), inflamación crónica (respuesta retrasada, respuesta específica, algunas semanas o más), inflamación subaguda (una etapa intermedia entre la inflamación aguda y la
20 inflamación crónica, características de los productos mixtos de mononucleares y polimorfonucleares).

Asimismo, además de los factores peptídicos, factores tales como prostaglandinas, leucotrienos, factores lipídicos que incluyen el factor activador de plaquetas (FAP), enzimas sintéticas del factor de inflamación, radicales libres tales como NO (óxido nítrico), muchos tipos de moléculas de adhesión celular, sistema inmunitario, y factores de coagulación pueden producir la inflamación.

25 Una vez que una célula está dañada debido a agentes causantes conocidos de la inflamación tales como factores biológicos externos (microbios, virus, parásitos), factores físicos (estímulos mecánicos, calor, radiación, electricidad), y factores químicos, se liberan histamina y quinina. La histamina y quinina liberadas darán como resultado angiectasia, un aumento de la permeabilidad de los capilares y concentración de macrófagos en el sitio de la inflamación, y esto produce un aumento en el caudal de sangre, edema, migración de inmunocitos y anticuerpos,
30 dolor y generación de calor.

Los tratamientos usados actualmente para la inflamación son fármacos sintéticos tales como ibuprofeno, antihistamínicos, esteroides, cortisona, agentes inmunosupresores, y agonistas inmunitarios; todos los cuales alivian solo temporalmente la inflamación. Estos fármacos no curan fundamentalmente la inflamación y tienen efectos secundarios tales como reacciones de hipersensibilidad, y deterioro del sistema inmunitario,
35 Por lo tanto, para un alivio eficaz de la inflamación, se llevan a cabo una investigación para desarrollar una sustancia que inhiba la expresión de las proteínas inflamatorias anteriormente mencionadas. Sin embargo, han surgido problemas en las sustancias antiinflamatorias que se habían desarrollado anteriormente. Se han desarrollado diversas categorías de fármacos antiinflamatorios incluyendo fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) y fármacos antiinflamatorios esteroideos (AIE); pero no solo estos fármacos tienen efectos secundarios tras su uso,
40 tampoco curan fundamentalmente la inflamación. Por lo tanto, existe una necesidad actual de fármacos antiinflamatorio que sean factibles física y económicamente. Como ejemplo, en inflamaciones agudas o crónicas tales como artritis reumatoide crónica, no solo los fármacos antiinflamatorios no esteroideos suprimen la actividad enzimática de COX-2, son conocidos también por suprimir la actividad de COX-1, lo que produce efectos secundarios tales como trastornos gastrointestinales.

45 La presente invención se completó ya que los presentes inventores han descubierto que los péptidos derivados de telomerasa pueden tener propiedades antiinflamatorias.

Por tanto, el objeto de la presente invención es proporcionar un péptido novedoso.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar el polinucleótido que codifica el péptido novedoso.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga actividad antiinflamatoria.

50 Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición antiinflamatoria que utilice el péptido como principio activo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición cosmética que utilice este péptido como un principio activo.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que utilice este péptido como un principio activo.

5 El documento WO 00/02581 desvela péptidos que tienen las secuencias n.º 251 y n.º 267, que tienen las secuencias de aminoácidos REARPALLT y EARPALLTS, respectivamente. Se sugieren estos péptidos como inmunógenos para su uso en la vacunación del cáncer.

El documento WO 2011/101173 desvela péptidos derivados de telomerasa, que tienen longitudes de al menos 8 restos de aminoácidos.

10 El documento US 2007/190561 desvela un péptido que comprende la secuencia SEQ ID NO:2 y sugiere el uso de la misma para el tratamiento de cánceres, otras enfermedades de proliferación celular, trastornos inmunológicos e infertilidad (o fertilidad).

Martínez P y col., 2011, Nature Reviews Cancer 11(3), 161-176, desvela y describe el papel de las proteínas teloméricas en cáncer y envejecimiento mediante modulación de la longitud del telómero y la protección, así como la regulación de la expresión génica mediante la unión a sitios no teloméricos.

Sumario de la invención

15 En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido con actividad antiinflamatoria, en el que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO:116, 117 y 118.

En otra realización, el péptido anteriormente mencionado se origina a partir de la telomerasa humana.

En una realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que codifica un péptido con actividad antiinflamatoria, en el que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118.

20 En una realización de la presente invención, se proporciona una composición antiinflamatoria que comprende un péptido como principio activo, en el que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 116, 117, y 118.

En otra realización de la composición, la composición anteriormente mencionada es para el tratamiento o la profilaxis de la enfermedad inflamatoria.

25 En otra realización de la composición, la composición anteriormente mencionada es una composición cosmética para mejorar o prevenir la inflamación de la piel.

En otra realización de la composición, la composición anteriormente mencionada es una composición farmacéutica para el tratamiento o la profilaxis de las enfermedades inflamatorias.

30 En otra realización de la composición, la composición anteriormente mencionada es una composición alimentaria para el tratamiento o la profilaxis de la inflamación.

En otra realización de la composición, la enfermedad inflamatoria anteriormente mencionada se caracteriza por seleccionar entre el grupo que consiste en (1) una enfermedad inflamatoria general o localizada (por ejemplo, alergias; enfermedad del inmunocomplejo; fiebre del heno; choque hipersensible; choque endotóxico; caquexia, hipertermia; granulomatosis; o sarcoidosis); (2) enfermedades gastrointestinales relacionadas (por ejemplo, apendicitis; úlcera gástrica; úlcera duodenal; peritonitis; pancreatitis; colitis ulcerosa, aguda, o isquémica; colangitis; colecistitis, esteatorrea, hepatitis, enfermedad de Crohn; o enfermedad de Whipple); (3) enfermedades dérmicas relacionadas (por ejemplo, psoriasis; quemaduras; quemaduras solares; dermatitis; Verrugas urticarias o habones); (4) enfermedades vasculares relacionadas (por ejemplo, angiitis; vasculitis; endocarditis; arteritis; aterosclerosis; tromboflebitis; pericarditis; insuficiencia cardíaca congestiva; miocarditis; isquemia de miocardio; periarteritis nodosa; estenosis recurrente; enfermedad de Buerger; o fiebre reumática); (5) enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma; epiglotitis; bronquitis; enfisema; rinitis; fibrosis quística; pneumonitis intersticial; EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de dificultad respiratoria de adulto; coniosis; alveolitis; bronquiolitis; faringitis; pleuresía; o sinusitis); (6) enfermedades relacionadas con los huesos, articulaciones, músculos y tejido conectivo (por ejemplo, granuloma eosinófilo; artritis; atralgia; osteomielitis; dermatomiositis; fasciitis; enfermedad de Paget; gota; enfermedad periodontal; artritis reumatoide; miastenia grave; espondilitis anquilosante; o sinovitis); (7) trastornos urogenitales (por ejemplo, epididimitis; vaginitis; prostatitis; o uretritis); (8) enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer; meningitis; encefalitis; esclerosis múltiple; infarto cerebral; embolismo cerebral; síndrome de Guillain-Barre; neuritis; neuralgia; lesión de médula espinal; parálisis; o uveítis); (9) virus (por ejemplo, gripe; virus sincitial respiratorio; VIH; hepatitis B; hepatitis C; o virus del herpes), enfermedad infecciosa (por ejemplo, fiebre del Dengue; o septicemia), infección fúngica (por ejemplo, candidiasis); o bacteriana, parasítica, e infección microbiana similar (por ejemplo, bacteremia diseminada; malaria; oncocerciasis; o amebiasis); (10) enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis; lupus; síndrome de Goodpasture; rechazo al injerto; enfermedad del injerto contra el huésped; o diabetes); y (11) cáncer o enfermedad tumoral (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin).

35
40
45
50

La invención permite un procedimiento para tratar o prevenir enfermedades inflamatorias administrando la composición antiinflamatoria.

5 En una realización de la presente invención, se proporciona un kit para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades inflamatorias que comprende: un péptido que se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118; e instrucciones que incluyen al menos una de una dosis de administración, la vía de administración, la frecuencia de administración, y la indicación del péptido o composición.

Aplicabilidad Industrial

10 De acuerdo con la presente invención, un péptido que tiene una secuencia de SEQ ID NO: 116, 117, o 118 tiene una excelente eficacia para suprimir la inflamación y en medios profilácticos. Por lo tanto, la composición que comprende los péptidos de la presente invención se puede usar como una composición farmacéutica antiinflamatoria o como una composición cosmética, a su vez, tratar y prevenir una variedad de diferentes tipos de enfermedades inflamatorias.

Referencias

15 KR2012-0130996A
KR2012-0133661A
KR2011-0060940A
US2011-0150873A1
Bonaldi T y col., EMBO J, (22)5551-60, 2003
20 Yankner BA y col, Science (Nueva York, N.Y.) [1990, 250(4978):279-282]
Dahlgren KN y col, J. Biol. Chem. 277:32046-32053, 2002.

Breve descripción de los dibujos

25 La FIG. 1 es una gráfica que muestra los resultados de llevar a cabo un ELISA de TNF- α con el cultivo de monocitos derivados de PBMC. Los monocitos se estimularon con LPS (10 ng/ml) durante dos horas, a continuación se hicieron reaccionar con cada péptido, FITC, FITC-TAT, PEP 1-FITC y el péptido FITC durante dos horas. (** P < 0,01. En comparación con el control negativo (FITC y FITC-TAT).

La FIG. 2 es una gráfica que muestra los resultados de llevar a cabo el análisis de la luciferasa de las líneas de células transfectantes HEK293/null y HEK293/TLR2 con luciferasa de NF- κ B, reaccionando a continuación con lipoproteína (10 ng/ml) y FITC y FITC-PEP1(4 μ M), e incubando durante 18 horas. Se obtuvieron resultados de la luciferasa mediante corrección usando renilla. (** P < 0,01, en comparación con el control negativo (Sin tratar) y en comparación con la muestra tratada con lipoproteína.)

30 La FIG. 3 a la FIG. 23 son los resultados del cribado de los efectos de inhibición de TNF- α sobre los monocitos. La FIG. 24 a la FIG. 46 son los resultados del cribado de los efectos de inhibición de TNF- α sobre la línea de células THP-1.

35 La FIG. 47 representa la viabilidad de los neurocitoblastos tratados con 0, 2,5, 5,0, 10, 20 y 40 μ M de proteína β amiloide. La FIG. 48 representa la proliferación de los neurocitoblastos tratados con 0, 2,5, 5,0, 10, 20 y 40 μ M de proteína β amiloide. La FIG. 49 representa la viabilidad de los neurocitoblastos tratados con 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μ M de PEP 1. La FIG. 50 representa la proliferación de los neurocitoblastos tratados con 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μ M de PEP1.

40 La FIG. 51 representa la viabilidad de los neurocitoblastos tratados con 1, 10, 50 y 100 μ M de PEP 1; los neurocitoblastos fueron dañados con 20 μ M de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la viabilidad celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

45 La FIG. 52 representa la toxicidad de los neurocitoblastos tratados con 1, 10, 50 y 100 μ M de PEP 1; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 μ M de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la toxicidad celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

50 La FIG. 53 representa la proliferación de los neurocitoblastos tratados con 1, 10, 50 y 100 μ M de PEP 1; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 μ M de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la proliferación celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

55 La FIG. 54 representa la migración de los neurocitoblastos tratados con 1, 10, 50 y 100 μ M de PEP 1; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 μ M de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la migración celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP 1).

60 La FIG. 55 representa la apoptosis de los neurocitoblastos tratados con 1, 10, 50 y 100 μ M de PEP 1; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 μ M de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la apoptosis celular tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

FIG. 56 representa el efecto inhibitor de ROS (Especies de oxígeno reactivo) de PEP1 en neurocitoblastos

dañados por el péptido beta amiloide; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 µM de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la inhibición de ROS tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1 (1, 10, 50 y 100µM). (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP 1).

La FIG. 57 representa los resultados de los niveles de expresión de la proteína analizados mediante (A) electroforesis 2Dy (B) Matriz de anticuerpos; los neurocitoblastos fueron dañados por 20 µM de proteína beta amiloide, y a continuación se midió el nivel de expresión de la proteína tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP1 (1, 10 and 50 µM). (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP 1).

La FIG. 58 representa los resultados de transferencia western que muestran el nivel de expresión de las proteínas relacionadas con la inflamación: los neurocitoblastos fueron dañados por 20 µM de proteína beta amiloide, y a continuación se trataron con diferentes concentraciones de PEP1 (1, 10 y 50 µM).

La FIG. 59 representa el efecto inhibitor de PEP 1 sobre la agregación de la proteína beta amiloide; (A) muestra la oligomerización reducida de las proteínas beta amiloides cuando se tratan simultáneamente con 1 µM de proteína beta amiloide y PEP 1 (0,1, 1 y 10 µM). (B) muestra el caso cuando PEP-1 se trató sobre la proteína β amiloide que se indujo ya para la agregación.

La FIG. 60 representa el efecto del inhibidore de PI3K, LY294002 sobre la viabilidad celular tratada con PEP 1. El aumento de la viabilidad celular tras tratar con PEP 1 disminuyó cuando se trató con LY294002.

La FIG. 61 a la FIG. 159 son los resultados del análisis de la transferencia western de los péptidos seleccionados que muestran la acumulación de HMGB1 en la célula.

Descripción detallada de la invención

Debido a que la presente invención puede tener adaptabilidad para diversas transformaciones y ejemplos de aplicación práctica, a continuación se ofrece una descripción más detallada de la presente invención. No obstante, esto no significa que limite la forma de la aplicación práctica; debe entenderse que la intención es incluir el concepto y la extensión de la tecnología en toda la transformación, equivalentes a alternativas. En la descripción de la presente invención, si se considera que cualquier descripción detallada acerca de la técnica anterior deteriora los principios fundamentales de la presente invención, se omitirá la descripción.

Se sabe que un telómero es una secuencia repetitiva de material genético en los extremos de cromosomas que evita que los cromosomas se dañen o se unan a otros cromosomas. La longitud de un telómero se acorta en cada división celular, y después de un determinado número de divisiones celulares, la longitud del telómero se acorta extremadamente en la medida que la célula deja de dividirse y muere. Por otra parte, se sabe que el alargamiento de los telómeros amplía el lapso de vida de una célula. Por ejemplo, las células cancerosas excretan una enzima denominada telomerasa, que evita el acortamiento de los telómeros, dando como resultado, por tanto, la proliferación de células cancerosas. La presente invención se llevó a cabo tras el descubrimiento de péptidos derivados de telomerasa con efectos antiinflamatorios.

En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido con actividades antiinflamatorias. El péptido se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118.

Los péptidos descritos en la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 179 son como se indica en la tabla 1. La SEQ ID NO: 180 relaciona el orden de longitud completa de la proteína telomerasa humana. La SEQ ID NO: 1 relaciona el péptido derivado de telomerasa que consiste en una secuencia de 16 aminoácidos. Los péptidos que se mencionan en la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 179 son como se indica en la siguiente tabla 1. La SEQ ID NO: 180 relaciona el orden de longitud completa de la proteína telomerasa humana. La SEQ ID NO: 1 relaciona el péptido derivado de telomerasa que consiste en una secuencia de 16 aminoácidos. Los péptidos en la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 77 son péptidos que incluyen la SEQ ID NO: 1. Los péptidos en la SEQ ID NO: 78 a la SEQ ID NO: 179 son fragmentos de péptidos de la SEQ ID NO: 1.

En la Tabla 1 siguiente, se usó el "nombre" para distinguir entre los péptidos. Más de un péptido de los péptidos mencionados en la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 179 comprende un "péptido sintético", un péptido sintetizado de áreas seleccionadas de la telomerasa. En la presente memoria descriptiva, el término "pep" en el presente documento se refiere a un péptido que tiene una cualquiera de la SEQ ID NO: 2 a la SEQ ID NO: 179, o, un péptido que comprende un 80% de homología de la secuencia de aminoácidos anterior con las secuencias anteriormente mencionadas, o un fragmento peptídico de los péptidos anteriormente mencionados.

Tabla 1

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
1.	pep1	[611-626]	EARPALLTSRLRFIPK	16 aa
2.	pep-RIA-1	[610-626]	REARPALLTSRLRFIPK	17 aa
3.	pep-RIA-2	[609-626]	HREARPALLTSRLRFIPK	18 aa
4.	pep-RIA-3	[608-626]	QHREARPALLTSRLRFIPK	19 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
5.	pep-RIA-4	[607-626]	RQHREARPALLTSRLRFIPK	20 aa
6.	pep-RIA-5	[606-626]	VRQHREARPALLTSRLRFIPK	21 aa
7.	pep-RIA-6	[605-626]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPK	22 aa
8.	pep-RIA-7	[604-626]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	23 aa
9.	pep-RIA-8	[603-626]	EAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	24 aa
10.	pep-RIA-9	[602-626]	SEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	25 aa
11.	pep-RIA-10	[601-626]	LSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	26 aa
12.	pep-RIA-11	[600-626]	ELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	27 aa
13.	pep-RIA-12	[599-626]	RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	28 aa
14.	pep-RIA-13	[598-626]	LRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	29 aa
15.	pep-RIA-14	[597-626]	QLRELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPK	30 aa
16.	pep-RIA-15	[610-627]	REARPALLTSRLRFIPKP	18 aa
17.	pep-RIA-16	[609-627]	HREARPALLTSRLRFIPKP	19 aa
18.	pep-RIA-17	[609-628]	HREARPALLTSRLRFIPKPD	20 aa
19.	pep-RIA-18	[610-628]	REARPALLTSRLRFIPKPD	19 aa
20.	pep-RIA-19	[608-627]	QHREARPALLTSRLRFIPKP	20 aa
21.	pep-RIA-20	[608-628]	QHREARPALLTSRLRFIPKPD	21 aa
22.	pep-RIA-21	[608-629]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDG	22 aa
23.	pep-RIA-22	[609-629]	HREARPALLTSRLRFIPKPDG	21 aa
24.	pep-RIA-23	[610-629]	REARPALLTSRLRFIPKPDG	20 aa
25.	pep-RIA-24	[607-627]	RQHREARPALLTSRLRFIPKP	21 aa
26.	pep-RIA-25	[607-628]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPD	22 aa
27.	pep-RIA-26	[607-629]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	23 aa
28.	pep-RIA-27	[607-630]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	24 aa
29.	pep-RIA-28	[608-630]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	23 aa
30.	pep-RIA-29	[609-630]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGL	22 aa
31.	pep-RIA-30	[610-630]	REARPALLTSRLRFIPKPDGL	21 aa
32.	pep-RIA-31	[606-627]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKP	22 aa
33.	pep-RIA-32	[606-628]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	23 aa
34.	pep-RIA-33	[606-629]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	24 aa
35.	pep-RIA-34	[606-630]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	25 aa
36.	pep-RIA-35	[606-631]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	26 aa
37.	pep-RIA-36	[607-631]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	25 aa
38.	pep-RIA-37	[608-631]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	24 aa
39.	pep-RIA-38	[609-631]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	23 aa
40.	pep-RIA-39	[610-631]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLR	22 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
41.	pep-RIA-40	[605-627]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKP	23 aa
42.	pep-RIA-41	[605-628]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	24 aa
43.	pep-RIA-42	[605-629]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	25 aa
44.	pep-RIA-43	[605-630]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	26 aa
45.	pep-RIA-44	[605-631]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	27 aa
46.	pep-RIA-45	[605-632]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	28 aa
47.	pep-RIA-46	[606-632]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	27 aa
48.	pep-RIA-47	[607-632]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	26 aa
49.	pep-RIA-48	[608-632]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	25 aa
50.	pep-RIA-49	[609-632]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	24 aa
51.	pep-RIA-50	[610-632]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	23 aa
52.	pep-RIA-51	[604-627]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKP	24 aa
53.	pep-RIA-52	[604-628]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPD	25 aa
54.	pep-RIA-53	[604-629]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDG	26 aa
55.	pep-RIA-54	[604-630]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGL	27 aa
56.	pep-RIA-55	[604-631]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLR	28 aa
57.	pep-RIA-56	[604-632]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	29 aa
58.	pep-RIA-57	[604-633]	AEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	30 aa
59.	pep-RIA-58	[605-633]	EVRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	29 aa
60.	pep-RIA-59	[606-633]	VRQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	28 aa
61.	pep-RIA-60	[607-633]	RQHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	27 aa
62.	pep-RIA-61	[608-633]	QHREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	26 aa
63.	pep-RIA-62	[609-633]	HREARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	25 aa
64.	pep-RIA-63	[610-633]	REARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	24 aa
65.	pep-RIA-64	[611-627]	EARPALLTSRLRFIPKP	17 aa
66.	pep-RIA-65	[611-628]	EARPALLTSRLRFIPKPD	18 aa
67.	pep-RIA-66	[611-629]	EARPALLTSRLRFIPKPDG	19 aa
68.	pep-RIA-68	[611-631]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLR	21 aa
69.	pep-RIA-69	[611-632]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRP	22 aa
70.	pep-RIA-70	[611-633]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPI	23 aa
71.	pep-RIA-71	[611-634]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIV	24 aa
72.	pep-RIA-72	[611-635]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVN	25 aa
73.	pep-RIA-73	[611-636]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNM	26 aa
74.	pep-RIA-74	[611-637]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMD	27 aa
75.	pep-RIA-75	[611-638]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDY	28 aa
76.	pep-RIA-76	[611-639]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYV	29 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
77.	pep-RIA-77	[611-640]	EARPALLTSRLRFIPKPDGLRPIVNMDYVV	30 aa
78.	pep-RIA-78	[611-625]	EARPALLTSRLRFIP	15 aa
79.	pep-RIA-79	[611-624]	EARPALLTSRLRFI	14 aa
80.	pep-RIA-80	[611-623]	EARPALLTSRLRF	13 aa
81.	pep-RIA-81	[611-622]	EARPALLTSRLR	12 aa
82.	pep-RIA-82	[611-621]	EARPALLTSRL	11 aa
83.	pep-RIA-83	[611-620]	EARPALLTSR	10 aa
84.	pep-RIA-84	[611-619]	EARPALLTS	9 aa
85.	pep-RIA-85	[611-618]	EARPALLT	8 aa
86.	pep-RIA-86	[611-617]	EARPALL	7 aa
87.	pep-RIA-87	[611-616]	EARPAL	6 aa
88.	pep-RIA-88	[611-615]	EARPA	5 aa
89.	pep-RIA-89	[611-614]	EARP	4 aa
90.	pep-RIA-90	[611-613]	EAR	3 aa
91.	pep-RIA-91	[612-626]	ARPALLTSRLRFIPK	15 aa
92.	pep-RIA-92	[613-626]	RPALLTSRLRFIPK	14 aa
93.	pep-RIA-93	[614-626]	PALLTSRLRFIPK	13 aa
94.	pep-RIA-94	[615-626]	ALLTSRLRFIPK	12 aa
95.	pep-RIA-95	[616-626]	LLTSRLRFIPK	11 aa
96.	pep-RIA-96	[617-626]	LTSRLRFIPK	10 aa
97.	pep-RIA-97	[618-626]	TSRLRFIPK	9 aa
98.	pep-RIA-98	[619-626]	SRLRFIPK	8 aa
99.	pep-RIA-99	[620-626]	RLRFIPK	7 aa
100.	pep-RIA-100	[621-626]	LRFIPK	6 aa
101.	pep-RIA-101	[622-626]	RFIPK	5 aa
102.	pep-RIA-102	[623-626]	FIPK	4 aa
103.	pep-RIA-103	[624-626]	IPK	3 aa
104.	pep-RIA-104	[612-625]	ARPALLTSRLRFIP	14 aa
105.	pep-RIA-105	[613-624]	RPALLTSRLRFI	12 aa
106.	pep-RIA-106	[614-623]	PALLTSRLRF	10 aa
107.	pep-RIA-107	[615-622]	ALLTSRLR	8 aa
108.	pep-RIA-108	[616-621]	LLTSRL	6 aa
109.	pep-RIA-109	[617-620]	LTSR	4 aa
110.	pep-RIA-110	[612-624]	ARPALLTSRLRFI	13 aa
111.	pep-RIA-111	[612-623]	ARPALLTSRLRF	12 aa
112.	pep-RIA-112	[612-622]	ARPALLTSRLR	11 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
113.	pep-RIA-113	[612-621]	ARPALLTSRL	10 aa
114.	pep-RIA-114	[612-620]	ARPALLTSR	9 aa
115.	pep-RIA-115	[612-619]	ARPALLTS	8 aa
116.	pep-RIA-116	[612-618]	ARPALLT	7 aa
117.	pep-RIA-117	[612-617]	ARPALL	6 aa
118.	pep-RIA-118	[612-616]	ARPAL	5 aa
119.	pep-RIA-119	[612-615]	ARPA	4 aa
120.	pep-RIA-120	[612-614]	ARP	3 aa
121.	pep-RIA-121	[613-625]	RPALLTSRLRFIP	13 aa
122.	pep-RIA-122	[613-623]	RPALLTSRLRF	11 aa
123.	pep-RIA-123	[613-622]	RPALLTSRLR	10 aa
124.	pep-RIA-124	[613-620]	RPALLTSR	8 aa
125.	pep-RIA-125	[613-619]	RPALLTS	7 aa
126.	pep-RIA-126	[613-618]	RPALLT	6 aa
127.	pep-RIA-127	[613-617]	RPALL	5 aa
128.	pep-RIA-128	[613-616]	RPAL	4 aa
129.	pep-RIA-129	[613-615]	RPA	3 aa
130.	pep-RIA-130	[614-625]	PALLTSRLRFIP	12 aa
131.	pep-RIA-131	[614-624]	PALLTSRLRFI	11 aa
132.	pep-RIA-132	[614-622]	PALLTSRLR	9 aa
133.	pep-RIA-133	[614-621]	PALLTSRL	8 aa
134.	pep-RIA-134	[614-620]	PALLTSR	7 aa
135.	pep-RIA-135	[614-619]	PALLTS	6 aa
136.	pep-RIA-136	[614-618]	PALLT	5 aa
137.	pep-RIA-137	[614-617]	PALL	4 aa
138.	pep-RIA-138	[614-616]	PAL	3 aa
139.	pep-RIA-139	[615-625]	ALLTSRLRFIP	11 aa
140.	pep-RIA-140	[615-623]	ALLTSRLRF	9 aa
141.	pep-RIA-141	[615-621]	ALLTSRL	7 aa
142.	pep-RIA-142	[615-620]	ALLTSR	6 aa
143.	pep-RIA-143	[615-619]	ALLTS	5 aa
144.	pep-RIA-144	[615-618]	ALLT	4 aa
145.	pep-RIA-145	[615-617]	ALL	3 aa
146.	pep-RIA-146	[616-625]	LLTSRLRFIP	10 aa
147.	pep-RIA-147	[616-624]	LLTSRLRFI	9 aa
148.	pep-RIA-148	[616-623]	LLTSRLRF	8 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
149.	pep-RIA-149	[616-622]	LLTSRLR	7 aa
150.	pep-RIA-150	[616-620]	LLTSR	5 aa
151.	pep-RIA-151	[616-619]	LLTS	4 aa
152.	pep-RIA-152	[616-618]	LLT	3 aa
153.	pep-RIA-153	[617-625]	LTSRLRFIP	9 aa
154.	pep-RIA-154	[617-624]	LTSRLRFI	8 aa
155.	pep-RIA-155	[617-623]	LTSRLRF	7 aa
156.	pep-RIA-156	[617-622]	LTSRLR	6 aa
157.	pep-RIA-157	[617-621]	LTSRL	5 aa
158.	pep-RIA-158	[617-619]	LTS	3 aa
159.	pep-RIA-159	[618-625]	TSRLRFIP	8 aa
160.	pep-RIA-160	[618-624]	TSRLRFI	7 aa
161.	pep-RIA-161	[618-623]	TSRLRF	6 aa
162.	pep-RIA-162	[618-622]	TSRLR	5 aa
163.	pep-RIA-163	[618-621]	TSRL	4 aa
164.	pep-RIA-164	[618-620]	TSR	3 aa
165.	pep-RIA-165	[619-625]	SRLRFIP	7 aa
166.	pep-RIA-166	[619-624]	SRLRFI	6 aa
167.	pep-RIA-167	[619-623]	SRLRF	5 aa
168.	pep-RIA-168	[619-622]	SRLR	4 aa
169.	pep-RIA-169	[619-621]	SRL	3 aa
170.	pep-RIA-170	[620-625]	RLRFIP	6 aa
171.	pep-RIA-171	[620-624]	RLRFI	5 aa
172.	pep-RIA-172	[620-623]	RLRF	4 aa
173.	pep-RIA-173	[620-622]	RLR	3 aa
174.	pep-RIA-174	[621-625]	LRFIP	5 aa
175.	pep-RIA-175	[621-624]	LRFI	4 aa
176.	pep-RIA-176	[621-623]	LRF	3 aa
177.	pep-RIA-177	[622-625]	RFIP	4 aa
178.	pep-RIA-178	[622-624]	RFI	3 aa
179.	pep-RIA-179	[623-625]	FIP	3 aa

ES 2 691 070 T3

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
180.	Telomerasa	[1-1132]	MPRAPRCRAVRSLLRSHYREVLPLATFVRR LGPQGWRLVQRGDPAAFRALVAQCLVCVP WDARPPPAAPSFQVSCCLKELVARVLQRL CERGAKNVLAFGFALLDGARGGPPEAFTTS VRSYLPNTVTDALRGSGAWGLLLRRVGDD VLVHLLARCALFVLVAPSCAYQVCGPLYQ LGAATQARPPPHASGPRRRLGCERAWNHS VREAGVPLGLPAPGARRRGGASRSRSLPLPK RPRRGAPEPERTPVGQGSWAHPGRTRG PSDRGFCVVSPARPAEEATSLEGALSGTR HSHPSVGRQHHAGPPSTRPPRPWDTPCP PVYAETKHFLYSSGDKEQLRPSFLLSSLRP SLTGARRLVETIFLGSRPWMPGTPRRLPRL PQRYWQMRPLFLELLGNHAQCPYGVLLKT HCPLRAAVTPAAGVCAREKPQGSVAAPEE EDTDPRRLVQLLRQHSSPWQVYGFVRACL RRLVPPGLWGSRHNERFLRNTKKFISLG KHAKLSLQELTW KMSVRDCAWLRRSPGVGCVPAAEHRLRE EILAKFLHWLMSVYVVELLRSFFYVTETTFQ KNRLFFYRKS VWSKLSIGIRQH LKRVQL RELSEAEVRQHREARPALLTSRLRFIPKPD GLRPVNM DYVVGARTFRREKRAERLTSRV	1132 aa

(continuación)

SEQ ID NO	NOMBRE	POSICIÓN EN LA TELOMERASA	SECUENCIA	LONGITUD
			KALFSVLNYERARRPGLLGASVGLDDIHR AWRTFVLRVRAQDPPPELYFVKVDVTGAY DTIPQDRLTEVIASIIKPQNTYCVRRYAVVQ KAAHGHVRKAFKSHVSTLTDLQPYMRQFV AHLQETSPLRDAVVIEQSSSLNEASSGLFD VFLRFMCHHAVRIRGKSYVQCQGIPQGSIL STLLCSLCYGD MENKLFAGIRRDG LLLRLV DDFLLVTPHLTHAKTFLRTLVRGVPEYGCV VNLRKTVVNFVPEDEALGGTAFVQMPAHG LFPWCGLLLDTRTLEVQSDYSSYARTSIRA SLTFNRGFKAGRNMRRKLFGLRLKCHSL FLDLQ VNSLQTVCTNIYKILLQAYRFHACVLQLPF HQQVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKN AGMSLGAKGAAGPLPSEAVQWLCHQAFLL KLTRHRVTYVPLLGSLRTAQTQLSRKLPGT TLTALEAAANPALPSDFKTILD	

5 En una realización de la presente invención, se proporciona un polinucleótido que codifica un péptido con actividades antiinflamatorias. El polinucleótido codifica un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118. El polinucleótido mencionado anteriormente permite la producción de los péptidos en grandes cantidades. Por ejemplo, el cultivo de vectores que incluye polinucleótidos que codifican péptidos permite la producción de péptidos en grandes cantidades.

En la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones, los términos "homología" e "identidad de secuencia" se usan de manera indistinta para indicar el grado de solapamiento de la secuencia entre dos secuencias de aminoácidos (o si es relevante: ácido nucleico).

10 Salvo que se indique otra cosa, la expresión "Identidad de secuencia" para los péptidos tal como se usa en el presente documento se refiere a la identidad de secuencia calculada como $(n_{ref} - n_{dif}) \cdot 100 / n_{ref}$, en la que n_{dif} es el número total de restos no idénticos en las dos secuencias cuando se alinean de tal manera que un número máximo de aminoácidos son idénticos y en la que n_{ref} es el número de restos en la más corta de las secuencias. Por lo tanto, la secuencia de ADN agtcagtc tendrá una identidad de secuencia del 75% con la secuencia aatcaatc ($n_{dif}=2$ y $n_{ref}=8$).

15 En algunas realizaciones, la identidad de la secuencia se determina mediante procedimientos convencionales, por ejemplo, Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, mediante la búsqueda del procedimiento de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444, utilizando el algoritmo CLUSTAL W de Thompson y col., 1994, Nucleic Acids Res 22:467380, mediante las implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group). Se puede usar también el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990, Mol. Biol. 215:403-10) del cual se puede obtener el software

a través del National Center for Biotechnology Information www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cuando se usan cualquiera de los algoritmos anteriormente mencionados, se usan los parámetros por defecto para la longitud de la "Ventana", penalización por hueco, etc.

5 Los cambios en la secuencia de aminoácidos pertenecen a las características físicas y químicas de los péptidos. Por ejemplo, la transformación de aminoácidos puede llevarse a cabo mejorando la estabilidad térmica del péptido, alterando la especificidad del sustrato, y cambiando el pH óptimo.

En una realización de la presente invención, un péptido que consiste en la SEQ ID NO: 116, 117, o 118 se origina en la telomerasa, más específicamente, la telomerasa de *Homo sapiens*.

10 El término "aminoácido" incluye en el presente documento no solo los 22 aminoácidos convencionales que se integran naturalmente en el péptido, sino también los D-isómeros y los aminoácidos transformados. Por lo tanto, en una realización específica de la presente invención, un péptido del presente documento incluye un péptido que tiene D-aminoácidos. Por otra parte, un péptido puede incluir aminoácidos no convencionales tales como aquellos que se han modificado posteriormente a la traducción. Los ejemplos de modificaciones posteriores a la traducción incluyen fosforilación, glicosilación, acilación (incluyendo acetilación, miristorilación, palmitoilación), alquilación, carboxilación, hidroxilación, glicación, biotinilación, ubiquitinilación, transformación en propiedades químicas (por ejemplo, β -eliminando la desimidación, desamidación) y transformación estructural (por ejemplo, formación de puente disulfuro).
15 Asimismo, se incluyen cambios de aminoácidos y los cambios de los aminoácidos se producen debido a una reacción química durante el proceso de combinación con reticulantes para la formación de un conjugado peptídico.

20 Un péptido desvelado en el presente documento puede ser un péptido natural que se ha identificado y aislado a partir de fuentes naturales. Por otra parte, cuando se comparan con los fragmentos peptídicos de la SEQ ID NO: 1, los péptidos divulgados en el presente documento pueden ser mutantes artificiales que comprenden uno o más aminoácidos sustituidos, eliminados y/o insertados. La alteración de aminoácidos en un polipéptido natural -no solo en mutantes artificiales- comprende la sustitución conservativa de aminoácidos que no altera el plegado y/o la activación de la proteína. Los ejemplos de sustituciones conservativas pertenecen al grupo que consiste en aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparaginas), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina), y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Se conocen en la técnica sustituciones de aminoácidos que no alteran generalmente la actividad específica de la presente invención. Las alteraciones que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly, y las alteraciones opuestas. En la tabla 2 siguiente se muestran otros ejemplos de sustituciones conservativas.
25
30

Tabla 2.

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de restos	Sustitución de restos preferible
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr

(continuación)

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de restos	Sustitución de restos preferible
Thr(T)	ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

La transformación sustancial de las propiedades biológica de los péptidos se lleva a cabo seleccionando una sustitución significativamente diferente en las siguientes eficacias: (a) la eficacia en el mantenimiento de la estructura de la estructura principal del polipéptido en el área de sustitución, tal como estructuras tridimensionales en hojas o hélices, (b) la eficacia en el mantenimiento de la carga eléctrica o la hidrofobicidad de la molécula en el área diana, o (c) la eficacia del mantenimiento del volumen de la cadena secundaria. Los restos naturales se dividen en grupos por propiedades generales de la cadena secundaria como las siguientes:

- (1) hidrofobicidad: Norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) hidrofiliidad neutra: cys, ser, thr;
- (3) acidez: asp, glu;
- (4) basicidad: asn, gin, his, lys arg;
- (5) resto que afecta la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) aromaticidad: trp, tyr, phe.

Se pueden llevar a cabo sustituciones no conservativas intercambiando un miembro de las anteriores clases con el de una clase diferente. Cualquier resto de cisteína que no esté relacionado con el mantenimiento de la estructura tridimensional adecuada del péptido puede normalmente sustituirse a serina, aumentando por tanto la estabilidad oxidativa de la molécula y evitando la reticulación inadecuada. Por el contrario, se puede conseguir la mejora de la estabilidad añadiendo uno o varios enlace(s) cisteína al péptido.

Los tipos alterados de variantes de aminoácidos de péptidos son aquellos que cambió el modelo de glicosilación. El término "cambio" en el presente documento se refiere a la delección de restos de hidratos de carbono y/o la adición de al menos un resto glicosilado que no existe en un péptido.

Las glicosilaciones en péptidos está normalmente conectadas a N o conectadas a O. La expresión "conectado a N" en el presente documento se refiere a que los restos de hidratos de carbono están unidos a la cadena secundaria de los restos de asparagina. Como secuencias tripeptídicas, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina (donde la X es cualquier aminoácido excepto prolina) son la secuencia de reconocimiento para unir el resto de hidrato de carbono enzimáticamente a la cadena secundaria de asparagina. Por lo tanto, con la presencia de una de estas secuencias tripeptídicas en un polipéptido, se crean sitios de glicosilación potencial. "glicosilación conectada a O" significa unir uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa, o xilosa a hidroxil aminoácidos. Los hidroxil aminoácidos más habituales son serina o treonina, pero se pueden usar 5-hidroxi prolina o 5-hidroxi lisina.

La adición de un sitio de glicosilación a un péptido se lleva a cabo convenientemente cambiando la secuencia de aminoácidos para contener una secuencia tripeptídica mencionada anteriormente (para los sitios de glicosilación unidos a N). Estos cambios pueden realizarse mediante la adición de al menos un resto de serina o treonina a la secuencia del primer anticuerpo, o mediante sustitución con aquellos restos (para los sitios de glicosilación unidos a O).

En una realización de la presente invención, un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico que puede ser una molécula de ADN o ARN espontánea o artificial, tanto monocatenaria como bicatenaria. La molécula de ácido nucleico puede ser uno o más ácidos nucleicos del mismo tipo (por ejemplo, que tiene una misma secuencia de nucleótidos) o ácidos nucleicos de diferentes tipos. Las moléculas de ácidos nucleicos comprenden uno o más ADN, ADNc, ADN señuelo, ARN, ARNip, miARN shARN, stARN, snoARN, snRNA PNA, oligómero de sentido contrario, plásmido y otros ácidos nucleicos modificados, pero sin limitarse a aquellos.

Una proteína HMGB1 se conoce como una citoquina. Esta experimenta en primer lugar la acetilación y la traslocación al citoplasma mediante estimulación externa. A continuación se secreta fuera de la célula, cumpliendo por tanto el papel de citoquina productora de inflamación. Puesto que, cuando se tiene una inflamación debida a dicha actividad, la proteína HMGB1 se secreta fuera de la célula, los pacientes con enfermedades inflamatorias tales como síndrome de Churg Strauss, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren presentarán niveles séricos elevados de HMGB1. Por lo tanto, si el núcleo contiene una gran cantidad de HMGB1 incluso cuando existe un estímulo que produce la inflamación, esto sugiere el hecho de que HMGB1 no se secreta fuera de la célula, lo que significa que la

inflamación se está suprimiendo.

En una realización de la presente invención, cuando se trata una célula con un péptido de la invención, aumenta la cantidad de HMGB1 en el núcleo. Esto representa que los péptidos mencionados anteriormente tienen excelentes efectos preventivos o supresores de la inflamación.

- 5 Asimismo, en realizaciones específicas de la presente invención, un péptido de la invención tiene una ventaja en que tiene una alta factibilidad debido a su baja toxicidad en una célula.

En la presente invención, una "enfermedad inflamatoria" es una indicación amplia que se refiere a cualquier enfermedad que designa la inflamación como causa principal o una inflamación producida por enfermedad. Específicamente, una enfermedad inflamatoria incluye (1) una enfermedad inflamatoria general o localizada (por ejemplo, alergias; enfermedad del inmunocomplejo; fiebre del heno; choque hipersensible; choque endotóxico; caquexia, hipertermia; granulomatosis; o sarcoidosis); (2) enfermedades gastrointestinales relacionadas (por ejemplo, apendicitis; úlcera gástrica; úlcera duodenal; peritonitis; pancreatitis; colitis ulcerosa, aguda, o isquémica; colangitis; colecistitis, esteatorrea, hepatitis, enfermedad de Crohn; o enfermedad de Whipple); (3) enfermedades dérmicas relacionadas (por ejemplo, psoriasis; quemaduras; quemaduras solares; dermatitis; Verrugas urticarias o habones); (4) enfermedades vasculares relacionadas (por ejemplo, angiitis; vasculitis; endocarditis; arteritis; aterosclerosis; tromboflebitis; pericarditis; insuficiencia cardíaca congestiva; miocarditis; isquemia de miocardio; periarteritis nodosa; estenosis recurrente; enfermedad de Buerger; o fiebre reumática); (5) enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma; epiglotitis; bronquitis; enfisema; rinitis; fibrosis quística; pneumonitis intersticial; EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de dificultad respiratoria de adulto; coniosis; alveolitis; bronquiolitis; faringitis; pleuresía; o sinusitis); (6) enfermedades relacionadas con los huesos, articulaciones, músculos y tejido conectivo (por ejemplo, granuloma eosinófilo; artritis; atralgia; osteomielitis; dermatomiositis; fasciitis; enfermedad de Paget; gota; enfermedad periodontal; artritis reumatoide; miastenia grave; espondilitis anquilosante; o sinovitis); (7) trastornos urogenitales (por ejemplo, epididimitis; vaginitis; prostatitis; o uretritis); (8) enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer; meningitis; encefalitis; esclerosis múltiple; infarto cerebral; embolismo cerebral; síndrome de Guillain-Barre; neuritis; neuralgia; lesión de médula espinal; parálisis; o uveítis); (9) virus (por ejemplo, gripe; virus sincitial respiratorio; VIH; hepatitis B; hepatitis C; o virus del herpes), enfermedad infecciosa (por ejemplo, fiebre del Dengue; o septicemia), infección fúngica (por ejemplo, candidiasis); o bacteriana, parasítica, e infección microbiana similar (por ejemplo, bacteremia diseminada; malaria; oncocerciasis; o amebiasis); (10) enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis; lupus; síndrome de Goodpasture; rechazo al injerto; enfermedad del injerto contra el huésped; o diabetes); y (11) cáncer o enfermedad tumoral (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), pero sin limitarse a aquellos.

Tratar el componente inflamatorio de dichas enfermedades ha sido una meta principal de la industria farmacéutica global durante numerosas décadas, y se han desarrollado una amplia variedad de tratamientos útiles. Los ejemplos incluyen los corticoesteroides (una gama de agentes naturales, semisintéticos y sintéticos diseñada para imitar el efecto del cortisol, incluyendo prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, fluticasona y así sucesivamente), inhibidores de la ciclooxigenasa (no selectivos o cox-1 selectivos, tales como indometacina, sulfasalazina y aspirina, y más recientemente cox-2 selectivos, tales como celecoxib), bloqueantes del leucotrieno (tales como monteleukast) y anti-TNF (tales como anticuerpos neutralizantes monoclonales modificados, incluyendo infliximab (Remicade™) y adalimumab (Humira™), proteínas de fusión del receptor TNF, tales como etanercept (Enbrel™), tales como inhibidores de la síntesis de TNF- α de molécula pequeña similares a talidomida).

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición antiinflamatoria que comprende un péptido de la invención como un principio activo.

En una realización de la presente invención, la composición antiinflamatoria puede contener 0,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 1 mg/mg , específicamente 1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 0,5 mg/mg , más específicamente 10 $\mu\text{g}/\text{mg}$ a 0,1 mg/mg de un péptido de la invención.

- 45 cuando el péptido está incluido en el intervalo anteriormente mencionado, puede satisfacerse toda la seguridad y estabilidad de la composición y es adecuada en términos de rentabilidad.

En una realización de la presente invención, la composición puede tener aplicación con todos los animales incluyendo seres humanos, perros, pollos, cerdos, vacas, ovejas, cobayas, y monos.

En una realización de la presente invención, se proporciona la composición médica para el uso del tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias con un principio activo que está comprendido por un péptido de la invención. En una realización de la presente invención, La composición farmacéutica puede administrarse mediante medios orales, rectales, transdérmicos, intravenosos, intramusculares, intraperitoneales, en la médula ósea, epidurales o subcutáneos.

Las formas de la administración oral pueden ser, aunque no de forma limitativa, comprimidos, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, solución, o emulsión. Las formas de administración no oral pueden ser, aunque no de forma limitativa, Inyecciones, goteros, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorios, parches, o pulverizaciones.

En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica, si es necesario, puede contener aditivos, tales como diluyentes, excipientes, lubricantes, aglutinantes, disgregantes, tampones, dispersantes, tensioactivos, agentes colorantes, aromáticos o edulcorantes. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede fabricarse mediante procedimientos convencionales de la industria en la materia.

- 5 En una realización de la presente invención, el principio activo de la composición médica puede variar de acuerdo con la edad, el sexo, el peso, la patología y el estado del paciente, la ruta de administración, o el criterio a cargo del médico que prescribe el tratamiento. La dosificación basada en estos factores se determina en los niveles de los expertos en la materia, y la dosis diaria, por ejemplo, puede ser, aunque no de forma limitativa, 0,1 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 1 g / kg / día, específicamente 1 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 10 mg / kg / día, más específicamente 10 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 1 mg / kg / día, más específicamente 50 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 100 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica puede administrarse, aunque no de forma limitativa, de 1 a 3 veces por día.

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición externa de la piel para la mejora o la prevención de la inflamación de la piel. La composición externa de la piel contiene un principio activo que es un péptido de la invención.

- 15 En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición cosmética para la mejora o la prevención de la inflamación de la piel. La composición cosmética contiene un principio activo que es un péptido de la invención.

- 20 En una realización de la presente invención, la composición de aplicación externa o composición cosmética puede proporcionarse en todas las formas adecuadas de aplicaciones tópicas. Por ejemplo, se pueden proporcionar formas como soluciones, emulsiones obtenidas mediante dispersión de una fase oleosa en agua, emulsión obtenida mediante dispersión de agua en una fase oleosa, suspensión, soporte sólido, gel, polvo, pasta, espuma o aerosol. Estas formas pueden fabricarse mediante procedimientos convencionales de la industria en la materia.

- 25 En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede incluir, dentro de niveles que no dañarán el efecto principal, otros ingredientes que pueden aumentar de forma deseable el efecto principal. En una realización de la presente invención, la composición cosmética puede incluir adicionalmente un hidratante, agentes emolientes, tensioactivos, absorbentes de UV, conservantes, fungicidas, antioxidantes, agentes de ajuste del pH, pigmentos orgánicos o inorgánicos, compuestos aromáticos, un agente de enfriamiento o antitranspirante. La relación de la formulación de los ingredientes anteriormente mencionados puede decidirse por los expertos en la materia dentro de los niveles que no dañarán el objeto y los efectos de la presente invención, y la relación de la formulación basada en el peso total de la composición cosmética puede ser de 0,01 a 5% en peso, específicamente de 0,01 a 3% en peso.

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición alimentaria para la prevención o la supresión de la inflamación. La composición alimentaria contiene un principio activo que es un péptido de la invención.

- 35 En una realización de la presente invención, la composición alimentaria no se limita a formas, sino que por ejemplo puede estar en forma de gránulos, polvo, líquidos, y formas sólidas. Cada forma puede estar formada con ingredientes comúnmente utilizados en la industria adecuadamente seleccionados por los expertos en la materia, además del principio activo, y puede aumentar el efecto con otros ingredientes.

- 40 La decisión para la dosificación en el principio activo anteriormente mencionado está comprendida en el nivel de los expertos en la materia, y la dosificación diaria, por ejemplo, puede ser de 1 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 10 mg / kg / día, más específicamente 10 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 1 mg / kg / día, más específicamente de 50 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$ a 100 $\mu\text{g} / \text{kg} / \text{día}$, aunque sin limitarse a estos números y puede variar de acuerdo con la edad, el estado de salud, las complicaciones y otros diversos factores.

- 45 En una realización de la presente invención, un péptido de la invención es para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria.

En una realización de la presente invención, se proporciona un kit para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades inflamatorias. El kit contiene: un péptido con actividad antiinflamatoria o una composición que comprende el péptido, de la invención; e instrucciones que incluyen al menos una de la dosis de administración, la vía de administración, la frecuencia de administración, y la indicación del péptido o composición.

- 50 Se pretende que los términos utilizados en el presente documento sean usados para describir las realizaciones, no para limitar la presente invención. Los términos sin número delante no se limitan a la cantidad sino que muestran que puede haber más de un significado del término utilizado. Los términos "que incluye", "que tiene", "que consiste", y "que comprende" deben de interpretarse abiertamente (es decir, "que incluye pero que no se limita a").

- 55 Se usa la mención del intervalo numérico en vez de indicar números separados en el intervalo, salvo que se indique de forma explícita, cada número puede leerse como números separados integrados en el presente documento. Se incluyen los valores finales de todos los intervalos en el intervalo y pueden combinarse de forma independiente.

Salvo que se señale otra cosa o se contradiga claramente en el contexto, todos los procedimientos mencionados en el presente documento pueden llevarse a cabo en el orden adecuado. El uso de una cualquiera de las realizaciones y de todas las realizaciones, o el lenguaje ilustrativo (por ejemplo, que utiliza "aproximadamente ~"), salvo que se incluya en las reivindicaciones, se utiliza para describir con más claridad la presente invención, no para limitar el ámbito de la presente invención. Cualquier lenguaje en el presente documento, excepción hecha de las reivindicaciones, no debe interpretarse como una necesidad de la presente invención. A menos que defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el significado comúnmente entendido por un experto en la materia a la cual pertenece la presente invención.

Las realizaciones preferidas de la presente invención son el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la presente invención. Pueden resultar evidentes a los expertos en la materia tras la lectura de las indicaciones anteriores las variaciones adicionales sobre las realizaciones preferidas. Los presentes inventores esperan que los expertos en la materia pueden utilizar las variaciones de forma adecuada y se pueda llevar a cabo la presente invención de otras maneras que las relacionadas en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención, como permite la ley de patentes, incluye equivalentes y sus variaciones, de los puntos clave de la invención indicados en las reivindicaciones adjuntas. Además, todas las posibles combinaciones comprendidas en cualquier combinación de los componentes anteriormente mencionados se incluyen en la presente invención, salvo que se indique de forma explícita otra cosa o contradiga el contexto. Aunque la presente invención se describe y se muestra mediante realizaciones ilustrativas, los expertos en la materia entenderán bien que puede haber diversos cambios en la forma y los detalles sin apartarse del espíritu y el ámbito de la invención, definidos por las siguientes reivindicaciones.

El factor de necrosis tumoral (TNF), particularmente TNF- α , se conoce porque se libera de las células inflamatorias y puede producir diversas reacciones citotóxicas, reacciones inmunológicas y reacciones inflamatorias. TNF- α es conocido por estar implicado en la incidencia y la prolongación de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias y produce además una septicemia y un choque séptico graves cuando se libera en la sangre y actúa sistémicamente. Debido a que TNF- α es un factor asociado ampliamente con el sistema inmunitario de un cuerpo vivo, el desarrollo de agentes que inhiban TNF- α se lleva a cabo de forma activa. TNF- α se biosintetiza en una forma inactiva y se convierte en una forma activa escindiéndose mediante la proteasa; la enzima responsable de la activación se denomina enzima convertidora del factor de necrosis tumoral (TACE). Por lo tanto, una sustancia que inhibe este TACE puede tratar, mejorar, o evitar enfermedades, dolencias patológicas, dolencias anómalas, inconvenientes, síntomas adversos y similares adscritos a TNF- α (KR2011-0060940A).

la proteína de la secuencia 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) existe en altas concentraciones en el timo, ganglios linfáticos, testículos, y en el hígado del feto, y con la excepción de hepatocitos y células del cerebro, existe usualmente en el interior del núcleo. La mencionada proteína HMGB1 tiene 3 dominios a consiste en la secuencia A, la secuencia B y el extremo C.

Se notificó por Tracey y col., en 1999 que la proteína HMGB1 tiene un papel como una citoquina que induce la inflamación, y el mecanismo de inducción de la inflamación de la mencionada HMGB1 es mediante un estímulo externo que produce la acetilación de HMGB1 que a continuación se mueve desde el núcleo al citoplasma. Posteriormente, se sabe que se secreta fuera de la célula, o se secreta fuera de la célula en necrosis. (Bonaldi T y col., EMBO J, (22)5551-60, 2003).

La invención se describe adicionalmente mediante las figuras, los siguientes ejemplos y experimentos, que son únicamente a fines de realizaciones específicas ilustrativas de la presente invención y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención de ninguna manera.

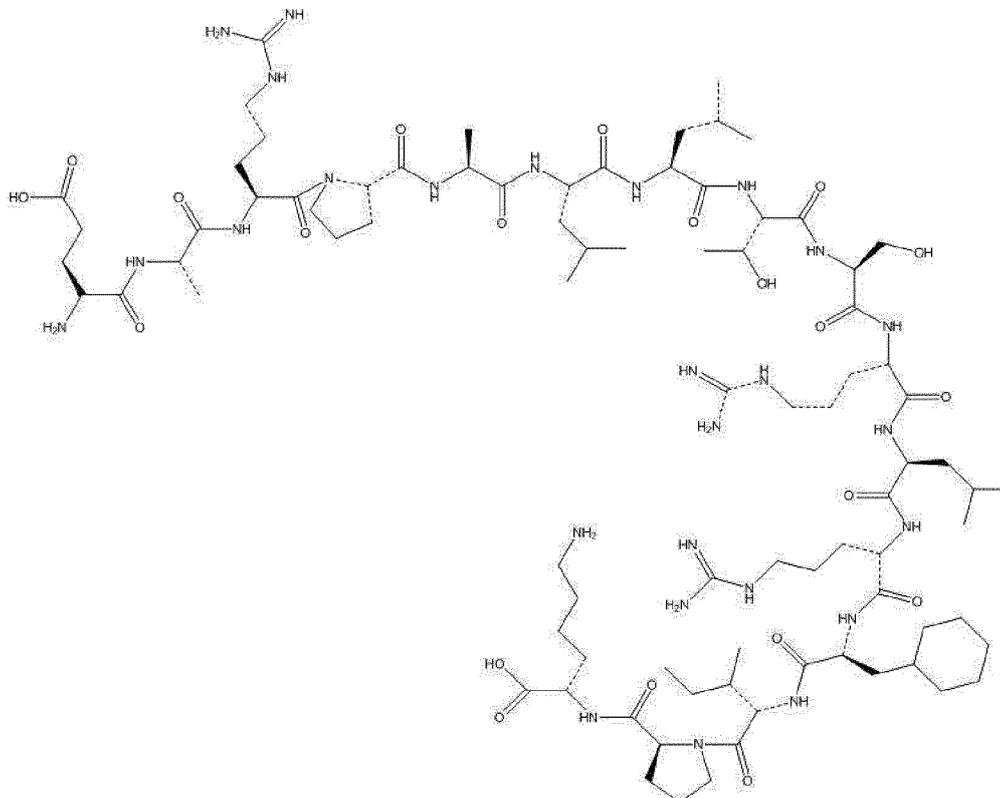
Ejemplo 1

Síntesis de PEP-1 y medición de las actividades antiinflamatorias de PEP-1 (SEQ ID NO: 1)

Experimento 1. Síntesis de PEP-1 (SEQ ID NO: 1)

Se sintetizó un péptido comprendido por 16 aminoácidos con la estructura química 1 como se indica a continuación que tenía la secuencia SEQ ID: 1 (PEP-1) derivada de la telomerasa humana:

<Estructura química 1>



Se sintetizó la SEQ ID NO: 1 (PEP-1) de acuerdo con el procedimiento existente de síntesis de péptidos en fase sólida. En detalle, se sintetizaron los péptidos acoplado cada aminoácido del extremo C mediante la síntesis en fase sólida de Fmoc, SPPS, utilizando ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon ROK). Aquellos péptidos cuyo primer aminoácido del extremo C estaba unido a la resina se utilizaron de la siguiente forma:

Resina de $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-cloro-Tritilo}$

Resina de $\text{NH}_2\text{-Ala-2-cloro-Tritilo}$

Resina de $\text{NH}_2\text{-Arg(Pbf)-2-cloro-Tritilo}$

Todos los materiales de aminoácidos para sintetizar el péptido se protegieron mediante Fmoc en el extremo N y los restos de aminoácidos se protegieron mediante Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil dihidrobenzofuran-5-sulfonil) que se puede disolver en ácido. Tal como:

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Trt-Ácido mercaptoacético.

HBTU[2-(hexafluorofosfato de 1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminio] / HOBt [N-Hidroxibenzotriazol] / NMM [4-metilmorfolina] se utilizaron como reactivos de acoplamiento. En 20% de DMF, se usó piperidina para eliminar Fmoc. Para eliminar la protección del resto o para separar el péptido sintetizado de la resina, se utilizó el cóctel de escisión [TFA (ácido trifluoroacético) / TIS (triisopropilsilano) / EDT (etanodiol) / $\text{H}_2\text{O}=92,5/2,5/2,5/2,5$].

Se sintetizó el péptido utilizando la estructura principal de la fase sólida en combinación con el aminoácido de partida con la protección del aminoácido, haciendo reaccionar los aminoácidos correspondientes por separado, lavando con disolvente y desprotegiendo, y repitiendo el procedimiento. Tras cortar el péptido sintetizado de la resina, se purificó mediante HPLC y se verificó para la síntesis mediante EM, y a continuación se liofilizó.

El proceso de síntesis específico de PERP1 se describe de la siguiente forma.

1) Acoplamiento

Se fundió el aminoácido (8 equivalentes) protegido con Resina de $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-cloro-Tritilo}$, y el agente de

acoplamiento HBTU(8 equiv.)/HOBt (8 equiv.)/NMM(16 equiv.) y se añadió a DMF, a continuación se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 2 horas, a continuación se lavó con DMF, MeOH, y DMF en este orden.

- 2) Desprotección de Fmoc
5 Se añadió piperidina al 20% en DMF, y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 5 minutos 2 veces, a continuación se lavó con DMF, MeOH, y DMF en este orden.
- 3) Se realizó el marco básico del péptido repitiendo las reacciones 1 y 2 repetidamente.
- 4) Escisión: Se añadió el cóctel de escisión al péptido completamente sintetizado y se separó el péptido de la resina.
- 10 5) Se añadió éter dietílico enfriado a la mezcla obtenida, y a continuación se usó centrifugación para precipitar el péptido clasificado.
- 6) Tras la purificación mediante HPLC-Prep, se comprobó el peso molecular mediante CL/EM y se liofilizó para producir en forma de polvo.

Experimento 2: Medición de la actividad antiinflamatoria de PEP 1

15 **Cultivo de líneas de células**

Macrófagos Raw 264.7 (KCBL, 40071) del Banco de Células de Corea se mantuvieron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; PAA, Austria) que contenía suero de feto de bovino al 10% (FBS; Gibco Laboratories), 100 unidades/ml de estreptomycin, y penicilina (Gibco Laboratories) a 37°C con CO₂ al 5%. se sembraron las células Raw 264.7 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1 x 10⁶ células/ml y se incubaron durante la noche.

- 20 Al día siguiente, se sustituyó el medio con medio reciente y se añadieron 5 µg/ml de péptido (obtenido como se describe en el ejemplo del Experimento 1) a las células. Tras 30 min de incubación de las células con el péptido, se añadieron 50 µl de LPS (hasta una concentración final de 1 µg/ml) y se incubaron las células durante 24 h más. La muestra experimental con la inducción de la respuesta inflamatoria se trató con 1 µg/ml de lipopolisacárido (LPS; Sigma, EE.UU.) y la muestra del control se trató con solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 7,2). Las muestras del sobrenadante de cada condición se recogieron en tubos eppendorf y se sometieron a análisis adicional.
- 25

Experimento 2-1. Análisis del nivel de NO

Se midió el nivel de óxido nítrico (NO) en células Raw 264.7 (1 x 10⁶ células/ml) usando el sistema del reactivo de Griess (Promega, EE.UU). Se añadieron 50 µl de medio de cultivo a una placa de 96 pocillo y se añadieron solución de reactivo I de Griess (NED) y reactivo II de Griess (Solución de sulfanilamida) en la misma cantidad. Tras 10 min de incubación de las células con los reactivos, se midió la densidad óptica a 540 nm en 30 min utilizando un lector de microplacas (Molecular Devices, EE.UU.). Se calculó la concentración de NO utilizando una curva convencional (0~100 µM) de nitrito de sodio.

30

- 35 Como se muestra en la Tabla 3 siguiente, la estimulación de células con LPS aumentó la expresión de NO, pero en el tratamiento simultáneo con LPS y Pep1, el nivel de expresión de NO mencionado anteriormente disminuyó. Se produjo NO durante la inflamación, y el resultado que muestra Pep1 redujo el nivel de Co al 65% del control, respaldando fuertemente el efecto antiinflamatorio de Pe1.

Tabla 3. La medición del efecto antiinflamatorio de PEP1 derivado de telomerasa humana

Muestra de ensayo		Nivel de expresión de NO del control (%)	Disminución del nivel de expresión de NO (%)
PBS		0	-
LPS 1 µg/ml	PBS	100	0
	PEP 1 (0,5 µg/ml)	35	65

Experimento 2-2. Análisis del efecto inhibidor de las citoquinas

- 40 Para investigar el efecto de PEP1 sobre la inhibición de la producción de citoquinas proinflamatorias, se pretrataron células RAW 264.7 con PEP 1 a una concentración de 5 µg/ml estimulada con LPS a una concentración de 1 µg/ml y se incubaron las células adicionalmente durante 24 h. Las muestras de sobrenadante que contenían medio de cultivo celular se recogieron y analizaron para los niveles de citoquinas utilizando kits ELISA (eBioscience, San Diego).

- 45 Se revistieron placas de 96 pocillos con 100 µl de anticuerpos de captura (diluidos en tampón de revestimiento a la concentración recomendada por el protocolo del fabricante) durante la noche a 4°C. A continuación, tras lavar las placas 5 veces, se añadieron 200 µl de diluyentes de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a

temperatura ambiente para el bloqueo. Tras lavar cada pocillo con tampón de ensayo cinco veces, la muestra de cultivo celular de cada muestra de proteína convencional de citoquina se diluyó y se añadieron 100 µl de cada a cada pocillo. Las placas que contenían las muestras se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, tras lavar la placa cinco veces con el tampón de lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado con avidina y se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente.

Tras la incubación con el anticuerpo secundario, la placa se lavó cinco veces y se incubó con 100 µl de avidina-HRP (BD Bioscience) durante 30 min a temperatura ambiente. Tras lavar la placa siete veces, se añadieron 100 µl de solución de TMB (Pierce) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 50 µl de H₂SO₄ 2N en cada pocillo. Se midió la densidad óptica a 450 nm utilizando un lector de microplacas. Se llevó a cabo el análisis estadístico mediante el análisis de la varianza utilizando el procedimiento ANOVA del programa SPSS, y se verificó la significancia entre análisis utilizando el ensayo del intervalo múltiple de Duncan.

Experimento 2-3. Medición de la secreción de IL-6

Como se muestra en la Tabla 4 siguiente, el tratamiento con LPS solo, aumentó la secreción de la citoquina IL-6 (interleuquina-6). Sin embargo, el tratamiento simultáneo con LPS y PEP-1 mostró una disminución en el nivel de secreción de la citoquina IL-6 proinflamatoria. Lo más importante, tras el tratamiento con PEP-1, el nivel de secreción de citoquinas proinflamatorias disminuyó en más de un 70%, lo que indica un efecto antiinflamatorio sólido de PEP1.

Tabla 4. Inhibición de la producción de la citoquina IL-6 mediante PEP-1

Muestra de ensayo		producción de la citoquina IL-6	
		% de control	inhibición en %
PBS		0	-
LPS 1 µg/ml	PBS	100	0
	PEP 1 (5µg/ml)	28	72

Experimento 2-4. HMGB1, TNF-α, Inhibición de la expresión de COX-2

Se determinó el nivel de expresión de la proteína mediante análisis de la transferencia Western. Se hicieron crecer células en medio que contenía PEP-1, se lavaron con PBS, se trataron con tripsina-EDTA al 0,05%, y se recogieron mediante centrifugación. Las células recogidas se disolvieron en un volumen adecuado de tampón de lisis. Los desechos intracelulares se aglomeraron mediante centrifugación, y se separó una cantidad igual de proteína de cada muestra mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La proteína separada se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Schleicherand Schuell, Keene, NH, EE.UU.), a continuación se ensayó para el anticuerpo específico de cada proteína. La membrana se incubó con una solución de ECL (quimioluminiscencia potenciada) (Amersham Life Science Corp., Arlington Heights, IL, EE.UU.), se expuso a rayos X, y se analizó el nivel de expresión de la proteína de acuerdo con el nivel de exposición que se muestra en la película de rayos X.

Se llevó a cabo el análisis de la transferencia Western para determinar el efecto inhibitor de Ppep1 sobre la expresión de la proteína citoquina. Como se muestra en la Tabla 5 siguiente, la estimulación de células con LPS aumentó la expresión de las citoquinas; HMGB1, TNF-α y COX. Sin embargo, si se trataron las células con LPS y Pep1, el nivel de expresión de las citoquinas proinflamatorias mencionadas anteriormente disminuyó. El resultado muestra que el tratamiento con Pep1 disminuyó los niveles de las citoquinas proinflamatorias en más de un 70% proporcionando una fuerte evidencia que apoya el efecto antiinflamatorio de Pep1.

Tabla 5. La medición del efecto inhibitor de Pep1 en el nivel de expresión de las citoquinas proinflamatorias.

Muestra de ensayo		Nivel de expresión de las citoquinas (intensidad de la banda) % del control		
		HMGB1	TNF-α	COX-2
PBS		-	-	-
LPS 1 µg/ml	PBS	100	100	100
	PEP 1 (5µg/ml)	30	25	22

Experimento 3: Investigación del efecto inhibitor de Pep1 sobre el nivel de TNF-α en células HepG2

Experimento 3-1: Cultivo de células

PBMC (célula mononuclear de sangre periférica) se separó de las muestras de sangre (50 ml) recogido a partir de sujetos sanos utilizando Ficol-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). A continuación se enriquecieron las PBMC en medio RPMI 1640 completo que contenía 20% de suero humano,

seguido por la transferencia a una placa de cultivo celular de poliestireno de 100 mm revestida con suero humano durante 30 min. Tras 2 h de incubación a 37°C y CO₂ al 5%, los monocitos se desprendieron de la parte inferior de la placa de cultivo celular utilizando PBS frío (Solución salina tamponada con fosfato) (Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.), y 1 x 10⁵ células se cultivaron en cada pocillo de placas de 96 pocillos en medio RPMI 1640 (suplementado con penicilina-estreptomicina; 100 mg/ml, suero humano; 20%) durante la noche.

Para el análisis de la luciferasa, Se utilizaron células HEK293/null (riñón embrionario humano) y HEK293/TRL que expresaban de forma estable TLR2 (receptor 2 de tipo toll) obtenidas de la Seoul National University School of Dental Medicine. Un día antes del experimento de la luciferasa, 2,5 x 10⁵ células se sembraron en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se cultivaron durante la noche en medio DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) (suplementado con blasticidina; 10 µg/ml, suero de feto de bovino; 10%)(Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)

Experimento 3-2: Ensayo de la citoquina

Para observar el efecto de PEP-1 sobre el nivel de TNF-α en términos del nivel de expresión de la proteína, se llevó a cabo un ELISA (enzimoinmunoanálisis de adsorción). 1 x 10⁵ monocitos derivados de PBMC se cultivaron en placas de 96 pocillos durante la noche. A continuación, se trató con LPS (lipopolisacárido; 10 ng/ml, Sigma) durante 2 horas, seguido por 3 lavados con PBS. A continuación se trató con medio OPTI-MEM (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) durante una hora para inducir la privación de alimento, y 4µM de FITC (Isotiocianato de fluoresceína), se trataron con FITC-TAT, PEP-1-FITC, y FITC-PEP-1 durante 2 horas antes de medir el nivel de TNF-α. Tras cultivar, se recogió la sopa de células y se midió la cantidad de TNF-α utilizando el kit ELISA (R&D, Minneapolis, MN, EE.UU.) como sigue:

La medición de TNF utiliza el procedimiento ELISA de tipo sándwich. Se añadieron 100 µl e anticuerpo primario contra TNF-α en cada pocillo de placas de 96 pocillos prerrevestidas, y la placa se incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó 3 veces con una solución de lavado de Tween20 al 05% durante 5 min cada una, y a continuación se añadieron 100 µl de cada muestra y una solución normalizada y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h, tras lavar la placa de forma igual a la anterior, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado con HRP a cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 2 h. De nuevo, se lavó la placa, y se añadió avidina/biotina para medir la absorbancia. Se cuantificó el nivel de TNF-α de cada muestra utilizando la gráfica normalizada de la absorbancia de la solución patrón.

Se estimularon monocitos derivados de PBMC con endotoxina LPS (10 ng/ml) durante 2 h, se sometieron a privación de alimento durante 1 h utilizando OPTI-MEM y a continuación 4 µM de FITC, FITC-TAT, PEP 1-FITC y FITC-PEP 1 durante 2 h. Tras la incubación, se midió el nivel de TNF-α con medio de cultivo celular utilizando ELISA. Como resultado, en el caso de FITC y FITC-TAT, el nivel de TNF-α aumento debido a LPS (6,2 y 6,7 ng/ml, respectivamente), pero el nivel de TNF-α disminuyó significativamente en el caso de PEP-1-FITC y FITC-PEP-1 (0,17 y 0,25 ng/ml, respectivamente) y la diferencia fue estadísticamente significativa (P < 0,01) (FIG. 1).

Experimento 3-3: Ensayo de la luciferasa

Para investigar el papel de PEP1 en la respuesta inflamatoria, los inventores evaluaron los modelos de expresión de NF-kB mediante el análisis de la luciferasa. En primer lugar, los inventores incubaron HEK293/null y HEK293/TLR2 (Graduate School of Dentistry, Seoul National University) en una placa de 12 pocillo durante 24 horas, para que se puedan obtener 2,5 x 10⁵ células/pocillo. Después de lavar con PBS tres veces, se sustituyó el medio con OPTI-MEM (Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y se incubó durante 4 horas, y a continuación se añadió una mezcla de 3 µl de lipofectamina (Invitrogen/Life Technologies), 1 µg de luciferasa de NF-kB y 10 ng de luciferasa de renilla (Promega, Madison, WI, EE.UU.) a cada pocillo y de nuevo se incubó durante 4 horas. Se colocó lipoproteína pam3cys (10ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en todos los pocillos excepto en aquellos del control negativo, y se trataron con FITC (4 µM) y FITC-PEP 1 (4 µM) durante 18 horas antes de que se lavaran con PBS durante tres veces. Los inventores confirmaron la activación de NF-kB mediante el luminómetro TD-20/20 (Turner designs, Sunnyvale, CA, EE.UU.) tras disolver (lisis) las células introduciendo 50 µl de tampón de lisis pasiva - proporcionado por el sistema de ensayo del indicador de la doble luciferasa (Promega) - en cada pocillo. Se confirmó la eficacia de la transfección mediante la transfección simultánea de pCMV-luciferasa de renilla (Promega), y los inventores analizaron los resultados calibrando los valores de la luciferasa.

Tras transfectar la luciferasa de NF-kB a las líneas de células HEK293/null y HEK293/TLR2, pam3cys, una lipoproteína sintética, y FITC (4 µM), un control negativo se trataron conjuntamente, y pam3cys con FITC-PEP 1 (4 µM) se trataron de nuevo conjuntamente para cultivarse durante 18 horas. La medición de los modelos de expresión de NF-kB mediante la intensidad de la luciferasa a través de la lisis de las células con tampón de lisis pasiva - proporcionado por el sistema de ensayo indicador de la doble luciferasa (Promega) mostró que no hubo diferencia en la lipoproteína o FITC-PEP1 tratadas o HEK293/null no tratadas. Sin embargo, cuando la lipoproteína, un agonista de TLR2, se trató con la línea de células HEK293/TLR2, aumentó la expresión de NF-kB (P<0,01) en comparación con la de sin tratar, confirmando la incidencia de respuestas inflamatorias. Asimismo, aumentó la expresión de NF-kB cuando FITC-PEP 1 se trató conjuntamente en comparación con sin tratar; y la expresión disminuyó en comparación con el control negativo en el que la lipoproteína y FITC se trataron conjuntamente (P<0,01) (FIG. 2). Por último, los inventores fueron capaces de confirmar que la respuesta inflamatoria que se puede

producir por TLR 2 se redujo cuando PEP 1 se trató conjuntamente.

Ejemplo 2

Efecto inhibidor de TNF- α de los péptidos de la serie PEP RIA (SEQ ID NO: 2 a 179)

5 Basándose en los resultados del Ejemplo 1 en el que la SEQ ID NO: 1 (PEP1) tiene el efecto inhibidor de TNF- α , se llevó a cabo el experimento utilizando los péptidos de la SEQ ID NO: 2 a 179 para confirmar su efecto inhibidor de TNF- α . La síntesis de los péptidos de la SEQ ID NO: 2 a 179 utilizó el mismo procedimiento mencionado anteriormente en el Ejemplo 1 (procedimiento utilizado para la síntesis de PEP1, pero los aminoácidos añadidos fueron diferentes.

Experimento 1: cultivo de células

10 Se separó la capa de PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de las muestras de sangre (50 ml) recogidas en sujetos sanos utilizando la solución de separación Biocoll (Biochrom AG, Berlín, Alemania). Las PBMC recogidas se enriquecieron en medio RPMI 1640 que contenía 20% de suero humano durante 30 min, y a continuación se transfirieron a una placa de cultivo de células de poliestireno de 100 mm revestida con suero humano para la incubación durante 2 h a 37°C, en una estufa incubadora con CO₂ al 5%. Los monocitos se
15 desprendieron de la parte inferior de la placa utilizando PBS frío, y se incubaron para alcanzar el número de 1 x 10⁵ células/pocillo en una placa de 96 pocillo con medio RPMI 1640 (suplementado con penicilina-estreptomycin; 100 mg/ml, suero humano; 20%) durante la noche.

Experimento 2: Análisis del efecto inhibidor de TNF- α

20 Se llevó a cabo ELISA para encontrar cómo los péptidos de la serie PEP RIA influyen el nivel de TNF- α . Se incubaron monocitos derivados de PBMC hasta alcanzar el número de 1 x 10⁵ células por pocillo en una placa de 96 pocillos y a continuación se trataron con LPS (lipopolisacárido; 10 ng/ml, Sigma) durante 2 horas. A los monocitos que se lavaron tres veces con PBS, se añadió el medio de cultivo OPTI-MEM para inducir la privación de alimento de las células durante una hora, se tomaron 4 μ M del péptido y se incubaron durante 2 horas. Hubo tres grupos de control negativos. El primer grupo no se trató con nada. El segundo grupo se trató con estrógeno (en este
25 experimento, se usó estradiol como tipo de estrógeno). El tercer grupo se trató con LPS (10 ng/ml) o con LPS (10 ng/ml) así como estrógeno (20 nM). PEP1, que se confirmó que tenía actividad inhibidora de TNF- α se utilizó como control positivo para medir la actividad inhibidora de TNF- α . Tras la incubación, se midió TNF- α siguiendo el manual del kit ELISA (R&D, Minneapolis, MN, EE.UU.). Los detalles del procedimiento de cuantificación se pueden encontrar en el Experimento 2.2 del Ejemplo 1.

30 Utilizando el procedimiento indicado anteriormente, se cribaron los péptidos con efecto inhibidor de TNF- α . Se estimularon monocitos derivados de PBMC con LPS (10 ng/ml), que es una endotoxina, durante 2 horas y se indujeron para la privación de alimento añadiendo OPTI-MEM durante 1 hora. Después de esto, se trataron 4 μ M de 179 péptidos y se incubaron durante 2 h. Se midió la cantidad de TNF- α en el medio de cultivo celular utilizando ELISA y se cribaron los péptidos con efecto inhibidor de TNF- α comparando los controles negativos y positivos (FIG.
35 3 a FIG. 23).

Las siguientes son las secuencias peptídicas que mostraron un efecto inhibidor de TNF- α cuando se compararon con el grupo del control que se trató solo con LPS: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO:10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36,
40 SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99,
45 SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 124, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 150, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 159, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID
50 NO: 168, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, y SEQ ID NO: 178.

Asimismo, las siguientes son las secuencias peptídicas que mostraron un efecto inhibidor de TNF- α cuando se compararon con el grupo tratado con LPS y estrógeno: SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO:
55 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 90, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO:

100, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 156, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 174.

5 Experimento 3: Análisis de péptidos que alteran el nivel de TNF- α en la línea de células THP1

Se llevó a cabo el experimento usando la línea de células THP-1 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU.) que es una leucemia monocítica aguda humana.

10 Las células THP-1 se incubaron para alcanzar el número de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillo con medio RPMI 1640 durante 24 h, seguido por la adición de 100 μ M de PMA (13-acetato 12 miristato de forbol) para la diferenciación en macrófagos. Tras la diferenciación de THP-1 en macrófagos mediante PMA durante un día, se trataron con LPS durante 2 h y se eliminaron mediante lavado. Seguido por la privación de alimento durante una hora y el tratamiento con PERP1.

15 Las células THP-1 diferenciadas mediante PMA se trataron con LPS (lipopolisacárido; 10 ng/ml, Sigma) durante 2 horas, seguido por 2 lavados con PBS. A las células, se añadió medio de cultivo OPTI-MEM para inducir la privación de alimento de las células durante una hora, y se tomó 1 μ M de 179 péptidos y se incubó durante 1 hora. Tras la incubación, se midió el nivel de TNF- α utilizando el kit ELISA y se cribaron los péptidos que reducían el nivel TNF- α (Figura 24 a Figura 46).

20 Como resultado, la secuencia peptídica SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109 y SEQ ID NO: 179 parecieron reducir el nivel de TNF- α en comparación con el grupo del control tratado solo con LPS. Además, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 112 y SEQ ID NO: 113 se seleccionaron como péptidos que reducen el nivel de expresión de TNF- α en comparación con el del grupo tratado con LPS y estrógeno.

Ejemplo 3

Análisis de la respuesta inflamatoria inducida por la proteína β amiloide

25 HMGB1 experimenta en primer lugar la acetilación y la translocación al citoplasma mediante estimulación externa. A continuación se secreta fuera de la célula, cumpliendo por tanto el papel de citoquina productora de inflamación. Puesto que, cuando se tiene una inflamación debida a dicha actividad, la proteína HMGB1 se secreta desde de la célula, y los pacientes con enfermedades inflamatorias tales como síndrome de Churg Strauss, artritis reumatoide y síndrome de Sjogren presentarán niveles séricos elevados de HMGB1. Por lo tanto, si el núcleo contiene una gran cantidad de HMGB1 incluso cuando existe un estímulo que produce la inflamación, esto sugiere el hecho de que HMGB1 no se secreta fuera de la célula, lo que significa que la inflamación se está suprimiendo.

30 Experimento 1: Análisis de supervivencia y proliferación de neurocitoblastos por los efectos antiinflamatorios de PEP-1

Lo primero de todo, Se preparó PEP-1 de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en el Ejemplo 1.

35 Experimento 1-1: Cultivo de neurocitoblastos y evaluación de la toxicidad del amiloide β

40 Tras retirar la corteza de la cabeza de un embrión de rata que se había gestado durante 13 días, se cultivó durante una semana con Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) para obtener los neurocitoblastos. Para analizar los efectos de la proteína β amiloide sobre los neurocitoblastos, la proteína β amiloide preoligomerizada de las concentraciones 0 a 40 μ M se trató sobre los neurocitoblastos durante 48 horas. A continuación se utilizó el ensayo CCK-8, BrdU, y TUNEL para la evaluación de la citotoxicidad (en referencia a BA Yankner y *col*, 1990 y KN Dahlgren y *col*, 2002). Los inventores utilizaron la misma concentración de la proteína β amiloide en experimentos posteriores tras confirmar que la supervivencia se redujo al 60% cuando se procesó con 20 μ M de la proteína β amiloide (En referencia a la FIG. 47 y 48).

Experimento 1-2: Evaluación de la toxicidad mediante tratamiento con PEP-1

45 Para evaluar el impacto de PEP-1 sobre los neurocitoblastos cultivados, los neurocitoblastos se cultivaron en primer lugar mediante un procedimiento bien conocido (BA Yankner *et al*, 1990 y KN Dahlgren y *col*, 2002). A continuación, se trataron concentraciones diferentes (0, 1, 10, 50, 100, 200 μ M) de PEP-1 durante 48 horas, seguido por las evaluaciones de la viabilidad celular y la proliferación utilizando el ensayo MTT, BrdU y el ensayo TUNEL. Las concentraciones de PEP-1 desde 0 a 200 μ M parecieron estables en el sistema neuronal ya que no inhiben la supervivencia y la proliferación de neurocitoblastos (en referencia a la Fig. 49 y 50).

Experimento 1-3: Evaluación de la toxicidad celular mediante el tratamiento simultáneo de proteína β amiloide y la telomerasa peptídica

Para determinar si PEP-1 tenía el efecto de suprimir la neurotoxicidad producida por la proteína β amiloide, 20 μ M de

proteína β amiloide y diversas concentraciones de PEP-1 se trataron simultáneamente durante 48 horas. La viabilidad celular y la apoptosis se midieron utilizando el ensayo MMT, el ensayo CCK-8, el ensayo LDH y el ensayo TUNEL, y el ensayo de proliferación de neurocitoblastos mediante el ensayo BrdU.

5 Los resultados del ensayo MMT y el ensayo CCK-8 confirmaron que 10 μ M de PEP-1 comenzaron a proteger los neurocitoblastos de la neurotoxicidad por el amiloide β , y la protección más eficaz se proporcionó en 100 μ M. (En referencia a la FIG. 51). se llevó a cabo el ensayo LDH para la evaluación del grado de muerte celular como otro procedimiento, y los inventores confirmaron que el aumento de la muerte celular debido al amiloide β disminuyó mediante PEP-1 y la eficacia se inició a una concentración 1 μ M (En referencia a la FIG. 52).

10 Los inventores confirmaron también con el ensayo BrdU que la disminución de la proliferación celular debida a la proteína β amiloide se restauró cuando se procesó con PEP-1 (En referencia a la FIG. 53).

15 La movilidad celular es una materia vital debido a la naturaleza de los neurocitoblastos. De acuerdo con los resultados experimentales de la movilidad celular, los inventores confirmaron que la disminución de la proliferación celular debida a la proteína β amiloide se restauró cuando se procesó con PEP-1 y que esta aumentó incluso más cuando se comparó una concentración 10 μ M con el control. Esto sugiere que en los ensayos clínicos futuros, el procesamiento antes del trasplante de citoblastos puede proporcionar resultados más efectivos. (En referencia a la FIG. 54).

20 Para confirmar el grado de daño de los neurocitoblastos, se llevó a cabo el ensayo TUNEL. se observó que la muerte de los neurocitoblastos aumentó significativamente en al grupo de tratamiento de la proteína β amiloide 20 μ M, y la muerte de neurocitoblastos disminuyó cuando se trató con 1 a 100 μ M de PEP-1. (En referencia a la FIG. 55)

25 Se investigó el mecanismo de acción del efecto protector de PEP-1 sobre la apoptosis por la proteína β amiloide. En primer lugar, se investigó si PEP-1 es capaz de minimizar el daño oxidativo producido por la proteína β amiloide. Se observó un cambio en la generación de especies de oxígeno reactivo tras el tratamiento con la proteína β amiloide y PEP-1 utilizando la tinción DCFDA (Molecular Probes, Eugene, OR). En el grupo en el que aumentaron las especies de oxígeno reactivo debido a 20 μ M de proteína β amiloide, el aumento de las especies de oxígeno reactivo disminuyó mediante el tratamiento con PEP-1 (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) (En referencia a la FIG. 56).

Experimento 1-4: Análisis comparativo de los niveles de expresión de la proteína entre los grupos tratados con y sin PEP-1

30 Se analizó el nivel de expresión de la proteína del grupo tratado con PEP-1 y el grupo sin tratar mediante la técnica de electroforesis 2D y la técnica de la micromatriz de anticuerpos. Se prepararon 200 μ g extrayendo proteoma de los neurocitoblastos cultivados en el Experimento 1-1 del ejemplo 3. Además, El grupo que no se trató con PEP-1 se usó como grupo comparativo en la misma condición.

35 se llevó a cabo la electroforesis 2D utilizando geles de acrilamida al 12%. se llevó a cabo en primer lugar la electroforesis en gel a PI 4~10N, utilizando un tamaño de 8,5x7cm. Tras la electroforesis, se tiñó con azul de Coomassie coloidal, y a continuación se comparó la expresión utilizando el software PDQuest para analizar cada mancha.

40 Se identificaron diferencias de más de 1,5 veces en los niveles de expresión utilizando MALDI-TOF MS (Espectrometría de masas en tiempo de vuelo con ionización mediante desorción por láser asistida por matriz). Entre estas, se identificaron proteínas correlacionadas con la señalización relacionada con la inflamación, tales como i-NOS y HMGB-1 (en referencia a la Tabla 6). Los cambios en los niveles de expresión de la proteína aumentaron o disminuyeron en 1,5 veces mediante la proteína β amiloide, pero esto confirmó que el nivel de expresión se reguló próximo al del control negativo cuando se añadió PEP-1 (En referencia a la FIG. 57).

45 Se llevó a cabo la micromatriz de anticuerpos utilizando el kit de señalización celular (CSAA1, kit de señalización celular de la micromatriz de Ab Panorama™), se escanearon los portas de la matriz mediante el escáner GenePix Personal 4100A (Molecular Devices) y se analizaron los datos mediante GenePix Pro 5.0 (Molecular Devices).

La siguiente Tabla 6 es un análisis de los niveles de expresión de las proteínas asociadas con la inflamación mediante la técnica de la electroforesis 2D. El grupo del control representa el nivel de expresión de la proteína de las células que no se trataron ni con proteína β amiloide ni con PEP-1. Este muestra un aumento o una disminución múltiple de la expresión de la proteína basándose en el nivel de expresión del grupo del control.

50 Los inventores confirmaron con los resultados del análisis que al igual que lo sugerido en la Tabla 6 siguiente, la expresión por exceso o la expresión por defecto de la proteína relacionada con la inflamación se controló mediante PEP-1; el nivel de expresión de la proteína estuvo próximo al del grupo del control negativo.

Tabla 6

Proteína	Control negativo	20 ug del grupo tratado con β -amiloide (plegado)	20 ug del grupo tratado con β -amiloide+PEP 1 (plegado)
HSP 70	1,0	-2,3	1,2
HSP 90	1,0	-1,8	1,0
HHGB1	1,0	-1,5	2,8
GADD 153	1,0	1,6	1,2
i-NOS	1,0	1,9	-1,1
e-NOS	1,0	1,9	-1,1
Pyk2	1,0	2,0	1,2
Quinasa MAP	1,0	2,2	1,0

La ruta de señalización de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT realiza un papel crucial en el crecimiento y la supervivencia de los neurocitoblastos. La ruta PI3K se activa por factores de crecimiento y factores reguladores, y está implicada en la regulación normal del crecimiento y la supervivencia de los neurocitoblastos. Las rutas de señalización de AKT desactivan algunos factores proapoptóticos, incluyendo una molécula de señalización apoptótico bien conocida, GSK3 β .

Para investigar adicionalmente los efectos antiinflamatorios de PEP-1, los inventores llevaron a cabo la transferencia Western sobre HMGB1, debido a que mostró un cambio principal en el análisis de la proteína. Como resultado, el procesamiento del PEP-1 aumentó los niveles de expresión de la proteína en las proteínas antiapoptóticas tales como Ki67, pAKT, PI3K, HSTF-1 y Bcl-2, y disminuyó los niveles de expresión de la proteína de las señales apoptóticas tales como Bax, GSK3 β , Citocromo-c, caspasa-3 (En referencia a la FIG. 58).

HMGB1, una proteína estructural no de histona que se une al ADN, realiza diversos papeles en la célula; tales como estabilizar la estructura del nucleosoma y regular la expresión génica. Como una de las sustancias causantes de la inflamación que se excreta en la última fase de la respuesta inflamatoria, se excreta por los macrófagos y los monocitos cuando se estimula la inflamación, pero cuando la neurona está dañada y conduce a la necrosis celular, se excretará fuera de la célula, dando lugar a una intensa respuesta inflamatoria. El aumento de HMGB1 por el tratamiento de PEP-1 tras la disminución debida al tratamiento con el β amiloide en el citoplasma de las células nerviosas refleja el hecho de que PEP-1 inhibe la secreción de HMGB1 producida fuera de la célula por la muerte celular de la neurona; sugiriendo por tanto que PEP-1 tiene potentes efectos antiinflamatorios (En referencia a la FIG. 58).

Además, los inventores investigaron la respuesta de PEP-1 a la agregación del amiloide β . La agregación de la proteína se inhibió cuando se trató con PEP-1 (En referencia a la FIG. 59 (A)) en la inducción de la agregación del amiloide β y la proteína experimentó la degradación cuando se trató con PEP-1 en la proteína β amiloide, cuya agregación ya había sido inducida (En referencia a la FIG. 59(B)).

En el mecanismo de acción de PEP-1, los inventores han confirmado anteriormente el aumento en la señalización de la supervivencia celular y la disminución en la señalización de la apoptosis de PI3K. Para investigar si estos efectos son directos o indirectos, Los inventores trataron con un inhibidor de PI3K, LY294002 (Promega). Como resultado, el aumento de la viabilidad celular tras tratar con PEP 1 disminuyó cuando se trató con LY294002. Por lo tanto, los inventores concluyen que PI3K está directamente asociado con el efecto neuroprotector de PEP 1 (En referencia a la FIG. 60).

PEP-1 inhibe la apoptosis de los neurocitoblastos mediante la proteína β amiloide. Asimismo, se confirmó la mejora de la movilidad celular de los neurocitoblastos, sugiriendo por tanto una variedad de posibilidades en la aplicación clínica. Los efectos de la inhibición de la neurotoxicidad producida por la proteína beta amiloide se verificaron por el efecto antiinflamatorio del mecanismo de acción de PEP 1, aumentaron los factores de supervivencia de los neurocitoblastos y disminuyeron los factores apoptóticos, especialmente la activación de la tuta de señalización de PI3K y los efectos antioxidantes.

Ejemplo 4

Efectos de los péptidos de la serie PEP RIA (Secuencia n.º 2 a 179) sobre la inflamación por la proteína β amiloide

Experimento 1. Cultivo de células

Células PC12 indiferenciadas (ATCC, Rockville, MD, EE.UU.) se mantuvieron en crecimiento en fase logarítmica sobre poli-L-lisina (Sigma, Saint Louis, MO, EE.UU.) - placas de 100mm prerrevestidas(Corning, PA, EE.UU.) en medio RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY, EE.UU.) que contenía suero de caballo inactivado térmicamente al

10%, suero de feto de bovino inactivado térmicamente al 5%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomicina. Se incubaron los cultivos a 37°C en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5%. se hicieron crecer los cultivos hasta una confluencia del 50% y se recogieron en una solución salina equilibrada de Hank exenta de Ca²⁺/Mg²⁺ que contenía EDTA 1 mM. Se sembraron en placas las células a una densidad de 1 x 10⁶ células/placa de 100mm durante 24 horas. Para la diferenciación neuronal, las células PC12 se privaron de suero durante 12 h (medio RPMI1640 que contenía 100 unidades/ml de penicilina y 100 g/ml de estreptomicina sin suero de caballo o suero de feto de bovino); posteriormente, las células se mantuvieron en medio exento de suero. Después de dos días, el medio se sustituyó con medio exento de suero. En el día tres, se añadió NGF (50 ng/ml, Sigma, Saint Louis, MO, EE.UU.) al medio, y los cultivos se mantuvieron durante tres días más. Tras la diferenciación, se incubaron células nPC12 con 20 µM de amiloide β con diversas concentraciones de péptidos [0 (control), 1, 10, y 50 µM] durante 48 h.

Experimento 2. Análisis de transferencia de Western

Se analizaron los niveles de HMGB1 mediante la transferencia western. En resumen, 5 X 10⁶ células se lavaron dos veces en PBS frío, se incubaron durante 10 min en hielo en tampón de lisis [Tris 50 mM (pH 8,0), NaCl 150 mM, azida de sodio al 0,02%, SDS al 0,2%, 100 µg/ml de fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), 50 µl/ml de aprotinina, Igepal 630 al 1%, NaF 100 mM, desoxicolato de sodio al 0,5%, EDTA 0,5 mM, EGTA 0,1 mM]; las células y núcleos no rotos se aglomeraron mediante centrifugación durante 10 min a 2000 x g y los lisados se clarificaron mediante centrifugación a 10.000 x g. Los anticuerpos utilizados fueron: anticuerpo dirigido contra HMGB1 (1:1000), Cell Signaling, Beverly, MA, EE.UU.) y anticuerpo dirigido contra β-tubulina (1:1000, Cell Signaling, Beverly, MA, EE.UU.). Las membranas se lavaron con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 al 0,05% (TBST) y a continuación se procesaron utilizando anticuerpo conjugado con HRP dirigido contra Ig de conejo (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, EE.UU.) seguido por detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech,). Se cuantificaron las manchas con un analizador de imágenes (GE Healthcare, ImageQuant LAS 4000).

Como resultado del análisis de la transferencia western, se seleccionaron los péptidos que mostraban acumulación de HMGB1 en la célula. La FIG 60 a la FIG. 159 son los resultados de las transferencias western de los péptidos seleccionados. Las tubulinas en estas figuras se utilizaron para confirmar la expresión de la proteína. las secuencias de los péptidos seleccionados son de la siguiente forma:

SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 147, SEQ ID NO: 148, SEQ ID NO: 149, SEQ ID NO: 153, SEQ ID NO: 154, SEQ ID NO: 155, SEQ ID NO: 157, SEQ ID NO: 158, SEQ ID NO: 164, SEQ ID NO: 165, SEQ ID NO: 166, SEQ ID NO: 167, SEQ ID NO: 170, SEQ ID NO: 171, SEQ ID NO: 172, SEQ ID NO: 173, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176, SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, y SEQ ID NO: 179.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> KAEL-GemVax Co., Ltd GemVax AS KIM, Sang Jae

<120> PÉPTIDOS ANTIINFLAMATORIOS Y COMPOSICIONES QUE COMPREDEN LOS MISMOS

<130> 19620PCT00

<150> KR 10-2012-0050529

<151> 11/05/2012

<150> KR 10-2012-0050533

<151> 11/05/2012

<150> KR 10-2012-0071989

<151> 02/07/2012

<150> KR 10-2012-0104144

<151> 19/09/2012

<150> KR 10-2012-0104207

<151> 19/09/2012

<160> 180
 <170> PatentIn versión 3.5
 <210> 1
 <211> 16
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15
 <210> 2
 10 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 Lys
 15 <210> 3
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15
 Pro Lys
 20 <210> 4
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 4
 Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15
 Ile Pro Lys
 30 <210> 5
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15
 Phe Ile Pro Lys
 20

ES 2 691 070 T3

<210> 6
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 6
 Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Ile Pro Lys
 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
 1 5 10 15
 Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20
 <210> 8
 <211> 23
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
 1 5 10 15
 Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20
 <210> 9
 <211> 24
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Glu Ala Glu Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr
 1 5 10 15
 Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20
 <210> 10
 <211> 25
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 10

ES 2 691 070 T3

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

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25

<210> 11
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

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

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25

<210> 12
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 12

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

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25

<210> 13
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 13

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

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25

<210> 14
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 14

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

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25

25

<210> 15
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 691 070 T3

<400> 15

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

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 20 25 30

<210> 16

<211> 18

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 16

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Pro

<210> 17

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 17

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro

<210> 18

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 18

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Asp
 20

20

<210> 19

<211> 19

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Asp

<210> 20

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

ES 2 691 070 T3

<400> 20

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro
 20

<210> 21

<211> 21

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro Asp
 20

<210> 22

10 <211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro Asp Gly
 20

<210> 23

15 <211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Asp Gly
 20

20 <210> 24

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 24

25

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

1 5 10 15

Lys Pro Asp Gly
 20

<210> 25

ES 2 691 070 T3

<211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro
 20

5

<210> 26
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro Asp
 20

<210> 27
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
 20

<210> 28
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 20

<210> 29
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 29

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 20

30

ES 2 691 070 T3

<210> 30
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 30
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 20
 <210> 31
 <211> 21
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Asp Gly Leu
 20
 <210> 32
 <211> 22
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 32
 Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Ile Pro Lys Pro
 20
 <210> 33
 <211> 23
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 33
 Val Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5 10 15
 Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp
 20
 <210> 34
 <211> 24
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 34

ES 2 691 070 T3

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

Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
 20

<210> 35
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 35

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

Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 20 25

<210> 36
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 36

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

Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20 25

<210> 37
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

15

<400> 37

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20 25

<210> 38
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 38

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20

25

<210> 39
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 691 070 T3

<400> 39

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20

<210> 40

<211> 22

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 40

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20

<210> 41

10 <211> 23

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro
 20

15 <210> 42

<211> 24

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 42

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp
 20

20 <210> 43

<211> 25

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 43

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
 20 25

<210> 44

<211> 26

ES 2 691 070 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
20 25

5 <210> 45
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
20 25

10 <210> 46
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

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

Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20 25

20 <210> 47
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

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

Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
20 25

25 <210> 48
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48

ES 2 691 070 T3

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10 15

Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20 25

5 <210> 49
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 49

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10 15

Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20 25

10 <210> 50
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 50

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10 15

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20

15 <210> 51
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20

20 <210> 52
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 52

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro
 20

25 <210> 53
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 691 070 T3

<400> 53

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp
 20 25

<210> 54

<211> 26

<212> PRT

<213> Homo sapiens

5

<400> 54

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly
 20 25

<210> 55

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

10

<400> 55

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu
 20 25

<210> 56

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

15

<400> 56

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg
 20 25

<210> 57

<211> 29

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 57

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

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20 25

<210> 58

<211> 30

25

ES 2 691 070 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 58

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

5 <210> 59
<211> 29
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 59

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

10 <210> 60
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 60

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

20 <210> 61
<211> 27
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 61

Arg Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10 15
Phe Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20 25

25 <210> 62
<211> 26
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 62

Gln His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5 10 15
Ile Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20 25

ES 2 691 070 T3

<210> 63
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 63

His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10 15

Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20 25

<210> 64
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 64

Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10 15

Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
20

<210> 65
<211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens

15 <400> 65

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

Pro

20 <210> 66
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 66

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys

1 5 10 15

Pro Asp

25 <210> 67
<211> 19
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 67

ES 2 691 070 T3

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

Pro Asp Gly

5 <210> 68
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 68

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

Pro Asp Gly Leu Arg
 20

10 <210> 69
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 69

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro
 20

15 <210> 70
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 70

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile
 20

20 <210> 71
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 71

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val
 20

25 <210> 72
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 72

ES 2 691 070 T3

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn
 20 25

5 <210> 73
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 73

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met
 20 25

10 <210> 74
 <211> 27
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp
 20 25

15 <210> 75
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 75

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr
 20 25

20 <210> 76
 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 76

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val
 20 25

25 <210> 77
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 691 070 T3

<400> 77

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

Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 20 25 30

<210> 78

<211> 15

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10 15

<210> 79

10 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 79

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10

15 <210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 80

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10

20 <210> 81

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

25 <400> 81

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10

<210> 82

<211> 11

30 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 82

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5 10

<210> 83

<211> 10

35 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 83

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
 1 5 10

<210> 84

ES 2 691 070 T3

<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 84
5 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
 1 5

<210> 85
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
10 <400> 85
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr
 1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <400> 86
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu
 1 5

<210> 87
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
20 <400> 87
 Glu Ala Arg Pro Ala Leu
 1 5

<210> 88
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
25 <400> 88
 Glu Ala Arg Pro Ala
 1 5

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 89
 Glu Ala Arg Pro
 1

<210> 90
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
40 <400> 90
 Glu Ala Arg
 1

ES 2 691 070 T3

<210> 91
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 91
 Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

 <210> 92
 <211> 14
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens
 <400> 92
 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 93
 <211> 13
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 93
 Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20 <400> 94
 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 95
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 25 <400> 95
 Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 96
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 96
 Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 97
 Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

 <210> 97
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 97
 Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10

ES 2 691 070 T3

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

5 <210> 98
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 98

Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

10 <210> 99
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 99

Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

15 <210> 100
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 100

Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

20 <210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 101

Arg Phe Ile Pro Lys
1 5

25 <210> 102
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 102

Phe Ile Pro Lys
1

35 <210> 103
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 103

Ile Pro Lys
1

40 <210> 104
<211> 14
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 104

ES 2 691 070 T3

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
 1 5 10
 <210> 105
 <211> 12
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens
 <400> 105
 Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10
 <210> 106
 <211> 10
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 106
 Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10
 <210> 107
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 107
 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5
 <210> 108
 <211> 6
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 108
 Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5
 <210> 109
 <211> 4
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 109
 Leu Thr Ser Arg
 1
 <210> 110
 <211> 13
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 110
 Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 1 5 10
 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens
 <400> 111
 <210> 111
 <211> 12
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens
 <400> 111

ES 2 691 070 T3

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
 1 5 10

5 <210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 112

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
 1 5 10

10 <210> 113
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 113

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
 1 5 10

15 <210> 114
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 114

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
 1 5

20 <210> 115
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 115

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
 1 5

25 <210> 116
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 30 <400> 116

Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr
 1 5

35 <210> 117
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 117

Ala Arg Pro Ala Leu Leu
 1 5

40 <210> 118
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 118

ES 2 691 070 T3

Ala Arg Pro Ala Leu
1 5

5 <210> 119
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 119

Ala Arg Pro Ala
1

10 <210> 120
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 120

Ala Arg Pro
1

15 <210> 121
<211> 13
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 121

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

20 <210> 122
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 122

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5 10

25 <210> 123
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

30 <400> 123

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5 10

35 <210> 124
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 124

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

40 <210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 125

ES 2 691 070 T3

Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser
1 5

5 <210> 126
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 126

Arg Pro Ala Leu Leu Thr
1 5

10 <210> 127
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 127

Arg Pro Ala Leu Leu
1 5

15 <210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 128

Arg Pro Ala Leu
1

20 <210> 129
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 129

Arg Pro Ala
1

25 <210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 130

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

35 <210> 131
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 131

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5 10

40 <210> 132
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 132

ES 2 691 070 T3

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5

5 <210> 133
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 133

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5

10 <210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 134

Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

15 <210> 135
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 135

Pro Ala Leu Leu Thr Ser
1 5

20 <210> 136
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 136

Pro Ala Leu Leu Thr
1 5

25 <210> 137
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 137

Pro Ala Leu Leu
1

35 <210> 138
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 138

Pro Ala Leu
1

40 <210> 139
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 139

ES 2 691 070 T3

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

5 <210> 140
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 140

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5

10 <210> 141
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 141

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu
1 5

15 <210> 142
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 142

Ala Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

20 <210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 143

Ala Leu Leu Thr Ser
1 5

25 <210> 144
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 144

Ala Leu Leu Thr
1

35 <210> 145
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 145

Ala Leu Leu
1

40 <210> 146
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 146

ES 2 691 070 T3

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5 10

5 <210> 147
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 147

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

10 <210> 148
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 148

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5

15 <210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 149

Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5

20 <210> 150
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 150

Leu Leu Thr Ser Arg
1 5

25 <210> 151
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 151

Leu Leu Thr Ser
1

35 <210> 152
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 152

Leu Leu Thr
1

40 <210> 153
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 153

ES 2 691 070 T3

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

5 <210> 154
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 154

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

10 <210> 155
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 155

Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5

15 <210> 156
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 156

Leu Thr Ser Arg Leu Arg
1 5

20 <210> 157
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 157

Leu Thr Ser Arg Leu
1 5

25 <210> 158
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
30 <400> 158

Leu Thr Ser
1

35 <210> 159
<211> 8
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 159

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro

1 5

40 <210> 160
<211> 7
<212> PRT

ES 2 691 070 T3

<213> Homo sapiens

<400> 160

Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

5

<210> 161

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 161

Thr Ser Arg Leu Arg Phe
1 5

10

<210> 162

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 162

Thr Ser Arg Leu Arg
1 5

15

<210> 163

<211> 4

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 163

Thr Ser Arg Leu
1

25

<210> 164

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 164

Thr Ser Arg
1

30

<210> 165

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 165

Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

35

<210> 166

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 166

Ser Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

40

<210> 167

ES 2 691 070 T3

<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 167

5 Ser Arg Leu Arg Phe
1 5

<210> 168
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 168

10 Ser Arg Leu Arg
1

<210> 169
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 169

15 Ser Arg Leu
1

<210> 170
<211> 6
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 170

20 Arg Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

<210> 171
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 171

25 Arg Leu Arg Phe Ile
1 5

<210> 172
<211> 4
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 172

30 Arg Leu Arg Phe
1

<210> 173
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 173

35 Arg Leu Arg
1

<210> 173
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 173

40 Arg Leu Arg
1

ES 2 691 070 T3

<210> 174
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
5 <400> 174
Leu Arg Phe Ile Pro
1 5

<210> 175
<211> 4
<212> PRT
10 <213> Homo sapiens
<400> 175
Leu Arg Phe Ile
1

<210> 176
<211> 3
15 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 176
Leu Arg Phe
1

<210> 177
<211> 4
20 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 177
Arg Phe Ile Pro
1

<210> 178
<211> 3
25 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 178
Arg Phe Ile
1

<210> 179
<211> 3
30 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 179
Phe Ile Pro
1

<210> 180
<211> 1132
40 <212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 180

ES 2 691 070 T3

Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15

His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30

Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45

Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60

Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80

Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
 85 90 95

ES 2 691 070 T3

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

ES 2 691 070 T3

Leu Lys Arg Val Gln Leu Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Val Arg Gln
 595 600 605
 His Arg Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile
 610 615 620
 Pro Lys Pro Asp Gly Leu Arg Pro Ile Val Asn Met Asp Tyr Val Val
 625 630 635 640
 Gly Ala Arg Thr Phe Arg Arg Glu Lys Arg Ala Glu Arg Leu Thr Ser
 645 650 655
 Arg Val Lys Ala Leu Phe Ser Val Leu Asn Tyr Glu Arg Ala Arg Arg
 660 665 670
 Pro Gly Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Gly Leu Asp Asp Ile His Arg
 675 680 685
 Ala Trp Arg Thr Phe Val Leu Arg Val Arg Ala Gln Asp Pro Pro Pro
 690 695 700
 Glu Leu Tyr Phe Val Lys Val Asp Val Thr Gly Ala Tyr Asp Thr Ile
 705 710 715 720
 Pro Gln Asp Arg Leu Thr Glu Val Ile Ala Ser Ile Ile Lys Pro Gln
 725 730 735
 Asn Thr Tyr Cys Val Arg Arg Tyr Ala Val Val Gln Lys Ala Ala His
 740 745 750
 Gly His Val Arg Lys Ala Phe Lys Ser His Val Ser Thr Leu Thr Asp
 755 760 765
 Leu Gln Pro Tyr Met Arg Gln Phe Val Ala His Leu Gln Glu Thr Ser
 770 775 780
 Pro Leu Arg Asp Ala Val Val Ile Glu Gln Ser Ser Ser Leu Asn Glu
 785 790 795 800
 Ala Ser Ser Gly Leu Phe Asp Val Phe Leu Arg Phe Met Cys His His
 805 810 815
 Ala Val Arg Ile Arg Gly Lys Ser Tyr Val Gln Cys Gln Gly Ile Pro
 820 825 830
 Gln Gly Ser Ile Leu Ser Thr Leu Leu Cys Ser Leu Cys Tyr Gly Asp
 835 840 845

ES 2 691 070 T3

Met Glu Asn Lys Leu Phe Ala Gly Ile Arg Arg Asp Gly Leu Leu Leu
850 855 860

Arg Leu Val Asp Asp Phe Leu Leu Val Thr Pro His Leu Thr His Ala
865 870 875 880

Lys Thr Phe Leu Arg Thr Leu Val Arg Gly Val Pro Glu Tyr Gly Cys
885 890 895

Val Val Asn Leu Arg Lys Thr Val Val Asn Phe Pro Val Glu Asp Glu
900 905 910

Ala Leu Gly Gly Thr Ala Phe Val Gln Met Pro Ala His Gly Leu Phe
915 920 925

Pro Trp Cys Gly Leu Leu Leu Asp Thr Arg Thr Leu Glu Val Gln Ser
930 935 940

Asp Tyr Ser Ser Tyr Ala Arg Thr Ser Ile Arg Ala Ser Leu Thr Phe
945 950 955 960

Asn Arg Gly Phe Lys Ala Gly Arg Asn Met Arg Arg Lys Leu Phe Gly
965 970 975

Val Leu Arg Leu Lys Cys His Ser Leu Phe Leu Asp Leu Gln Val Asn
980 985 990

Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
995 1000 1005

Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
1010 1015 1020

Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
1025 1030 1035

Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly
1040 1045 1050

Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
1055 1060 1065

Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
1070 1075 1080

Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
1085 1090 1095

ES 2 691 070 T3

Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
1100 1105 1110

Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
1115 1120 1125

Thr Ile Leu Asp
1130

REIVINDICACIONES

1. Un péptido con actividad antiinflamatoria, en el que el péptido se selecciona entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118.
2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el péptido se origina a partir de la telomerasa humana.
- 5 3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para su uso como un medicamento.
4. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias.
5. Un polinucleótido que codifica un péptido seleccionado del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 116, 117, y 118.
- 10 6. Una composición antiinflamatoria que comprende un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO:116, 117 y 118 como principio activo.
7. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades inflamatorias, en la que la composición es una composición farmacéutica.
8. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en la mejora o prevención de la inflamación de la piel, en la que la composición es una composición cosmética.
- 15 9. La composición antiinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento o la profilaxis de la inflamación, en la que la composición es una composición alimentaria.
10. La composición antiinflamatoria para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la enfermedad inflamatoria se selecciona entre el grupo que consiste en (1) una enfermedad inflamatoria general o localizada (por ejemplo, alergias; enfermedad del inmunocomplejo; fiebre del heno; choque hipersensible; choque endotóxico; caquexia, hipertermia; granulomatosis; o sarcoidosis); (2) enfermedades gastrointestinales relacionadas (por ejemplo, apendicitis; úlcera gástrica; úlcera duodenal; peritonitis; pancreatitis; colitis ulcerosa, aguda, o isquémica; colangitis; colecistitis, esteatorrea, hepatitis, enfermedad de Crohn; o enfermedad de Whipple); (3) enfermedades dérmicas relacionadas (por ejemplo, psoriasis; quemaduras; quemaduras solares; dermatitis; Verrugas urticarias o habones); (4) enfermedades vasculares relacionadas (por ejemplo, angiitis; vasculitis; endocarditis; arteritis; aterosclerosis; tromboflebitis; pericarditis; insuficiencia cardíaca congestiva; miocarditis; isquemia de miocardio; periarteritis nodosa; estenosis recurrente; enfermedad de Buerger; o fiebre reumática); (5) enfermedades respiratorias (por ejemplo, asma; epiglotitis; bronquitis; enfisema; rinitis; fibrosis quística; pneumonitis intersticial; EPOC (enfermedad pulmonar obstructiva crónica); síndrome de dificultad respiratoria de adulto; coniosis; alveolitis; bronquiolitis; faringitis; pleuresía; o sinusitis); (6) enfermedades relacionadas con los huesos, articulaciones, músculos y tejido conectivo (por ejemplo, granuloma eosinófilo; artritis; atralgia; osteomielitis; dermatomiositis; fasciitis; enfermedad de Paget; gota; enfermedad periodontal; artritis reumatoide; miastenia grave; espondilitis anquilosante; o sinovitis); (7) trastornos urogenitales (por ejemplo, epididimitis; vaginitis; prostatitis; o uretritis); (8) enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central o periférico (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer; meningitis; encefalitis; esclerosis múltiple; infarto cerebral; embolismo cerebral; síndrome de Guillain-Barre; neuritis; neuralgia; lesión de médula espinal; parálisis; o uveítis); (9) virus (por ejemplo, gripe; virus sincitial respiratorio; VIH; hepatitis B; hepatitis C; o virus del herpes), enfermedad infecciosa (por ejemplo, fiebre del Dengue; o septicemia), infección fúngica (por ejemplo, candidiasis); o bacteriana, parasítica, e infección microbiana similar (por ejemplo, bacteremia diseminada; malaria; oncocerciasis; o amebiasis); (10) enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis; lupus; síndrome de Goodpasture; rechazo al injerto; enfermedad del injerto contra el huésped; o diabetes); y
- 20 25 30 35 40 (11) cáncer o enfermedad tumoral (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin).
11. Un kit para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades inflamatorias que comprende: un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 116, 117 y 118, e instrucciones que incluyen al menos una de dosis de administración, vía de administración, frecuencia de administración, e indicación del péptido o composición.

FIG. 1

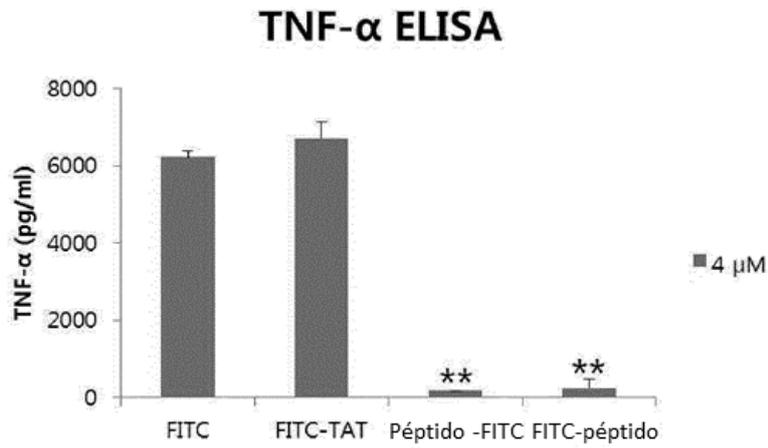


FIG. 2

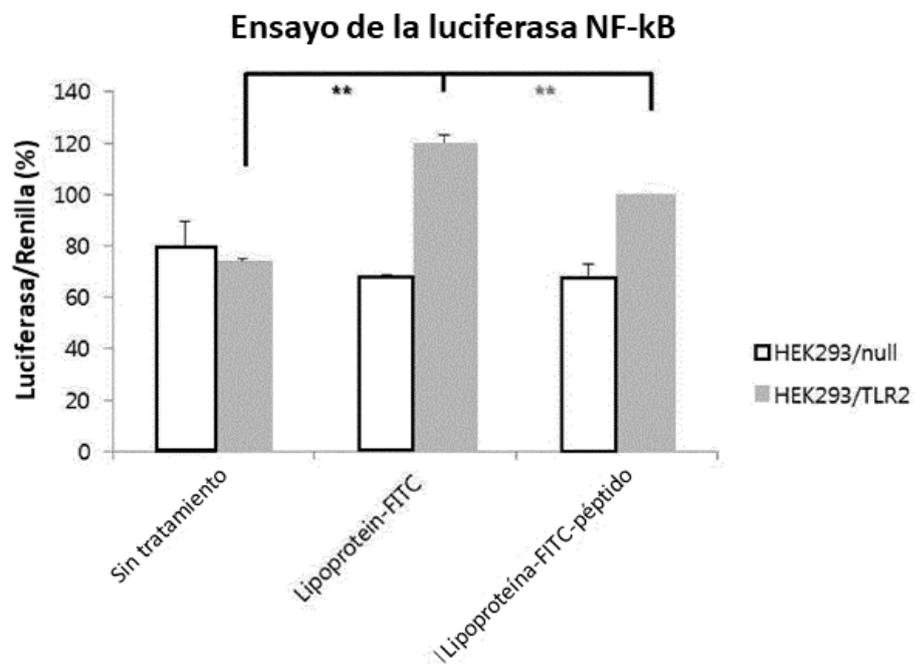


FIG. 3

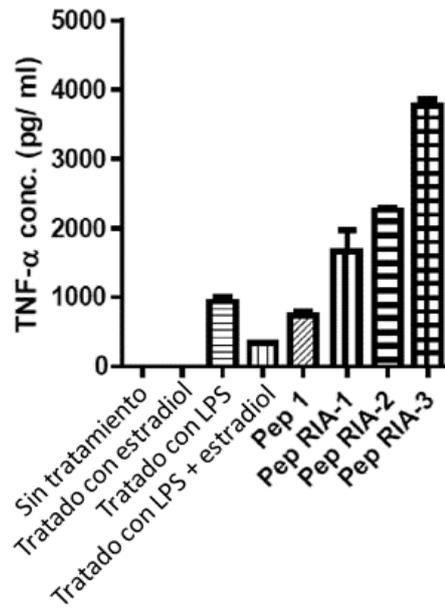


FIG. 4

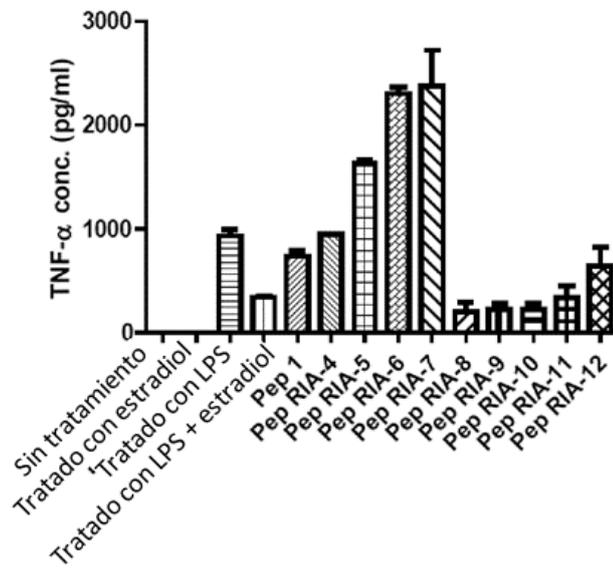


FIG. 5

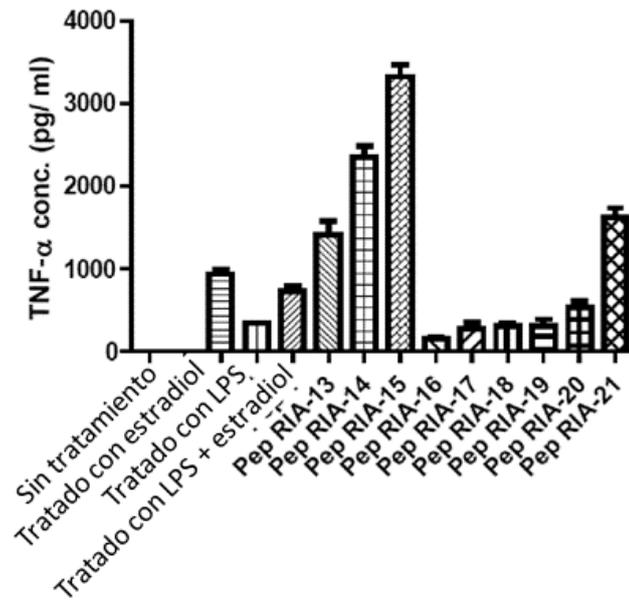


FIG. 6

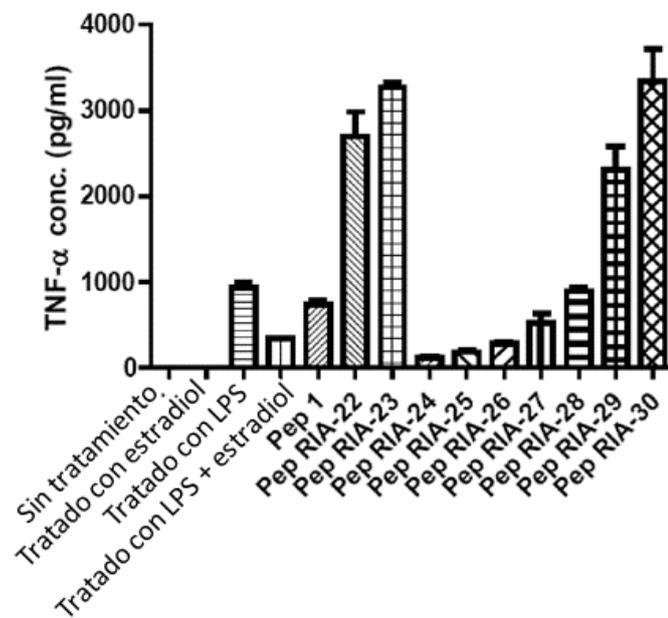


FIG. 7

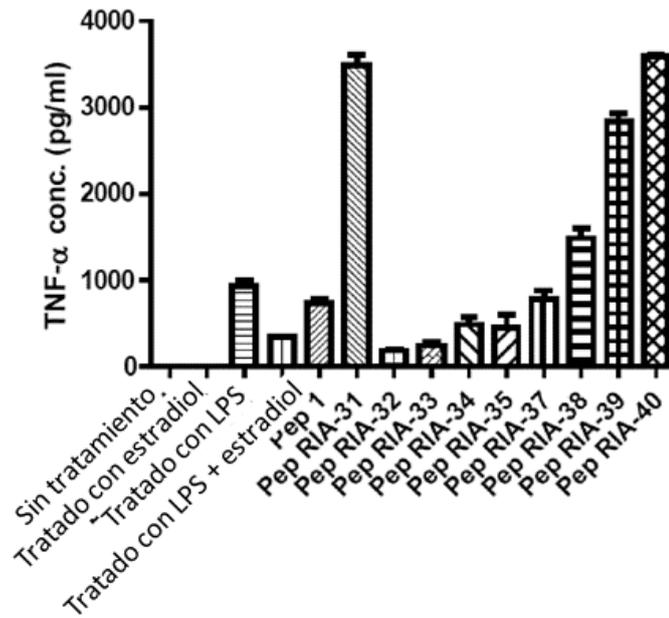


FIG. 8

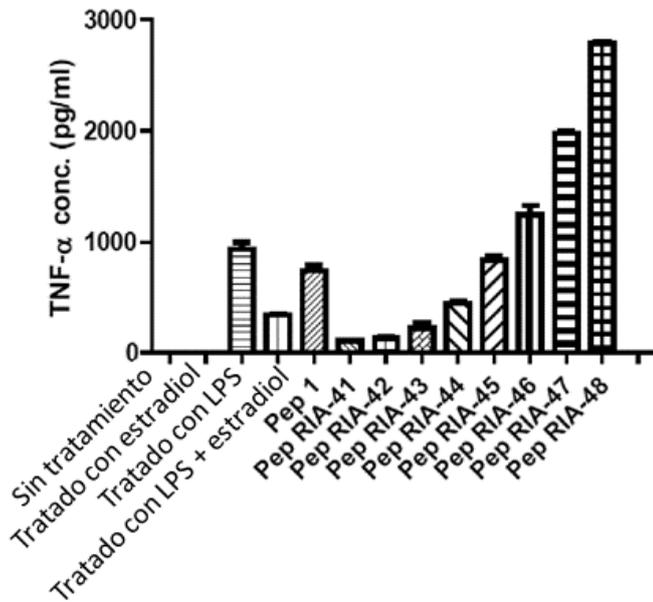


FIG. 9

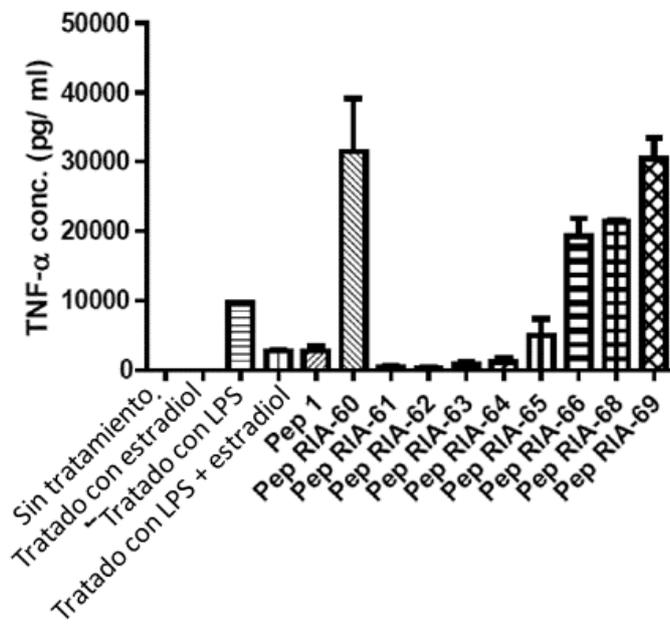
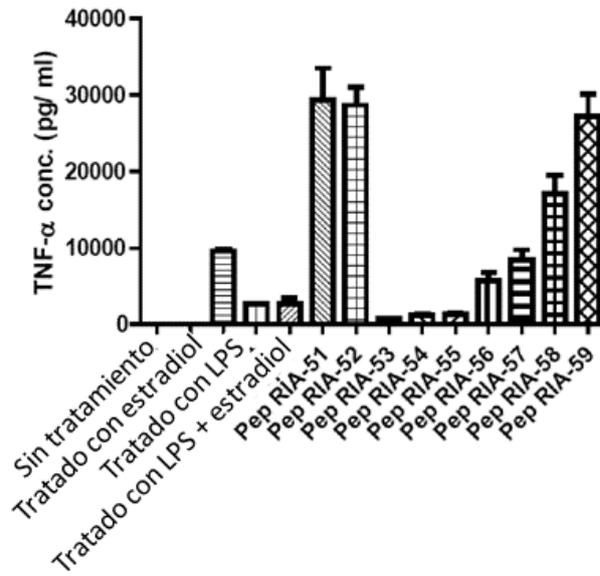


FIG. 10

FIG. 11

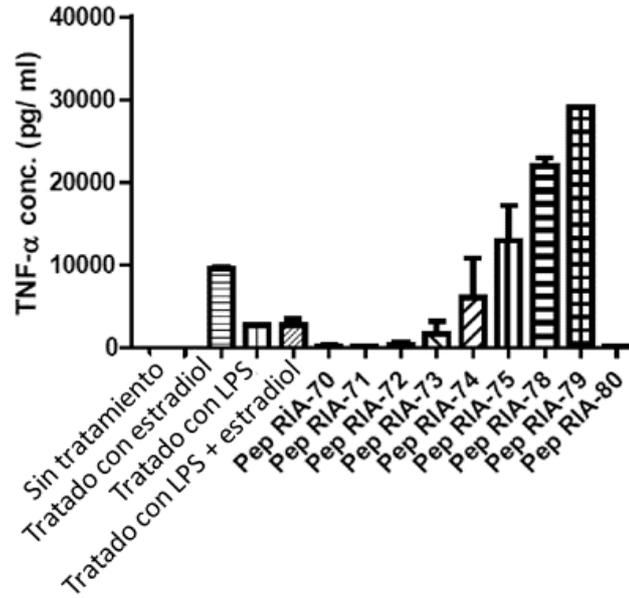


FIG. 12

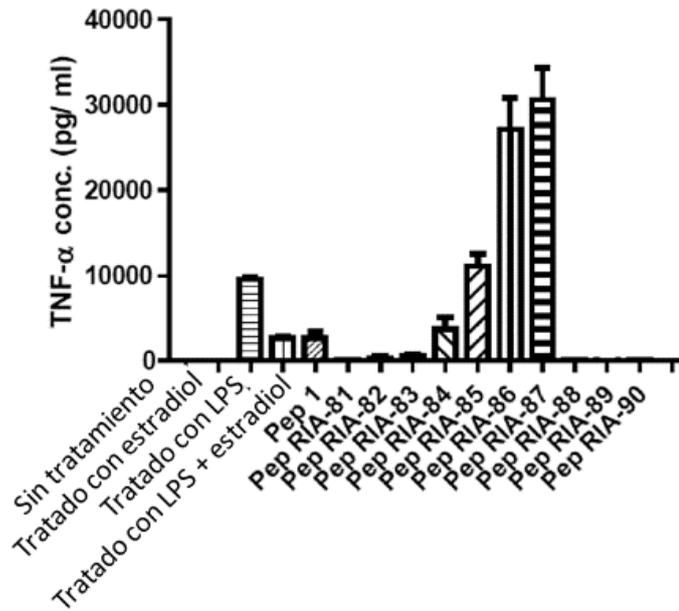


FIG. 13

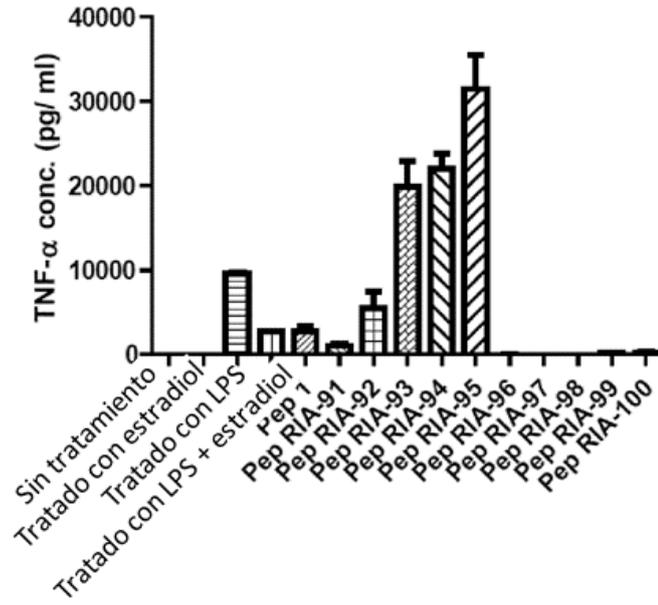


FIG. 14

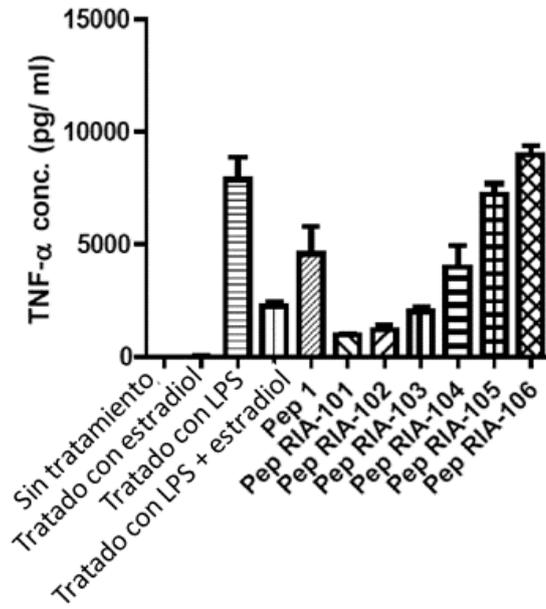


FIG. 15

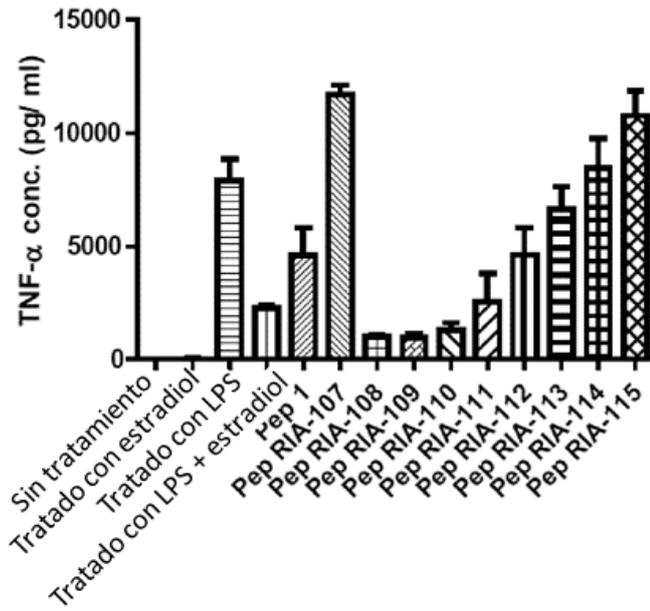


FIG. 16

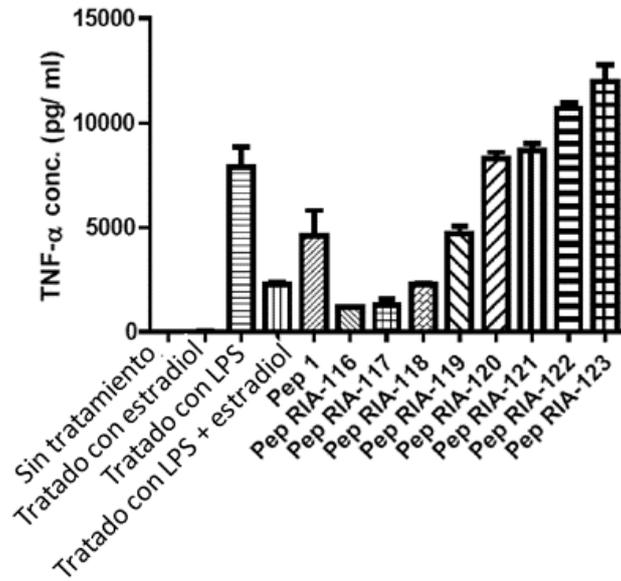


FIG. 17

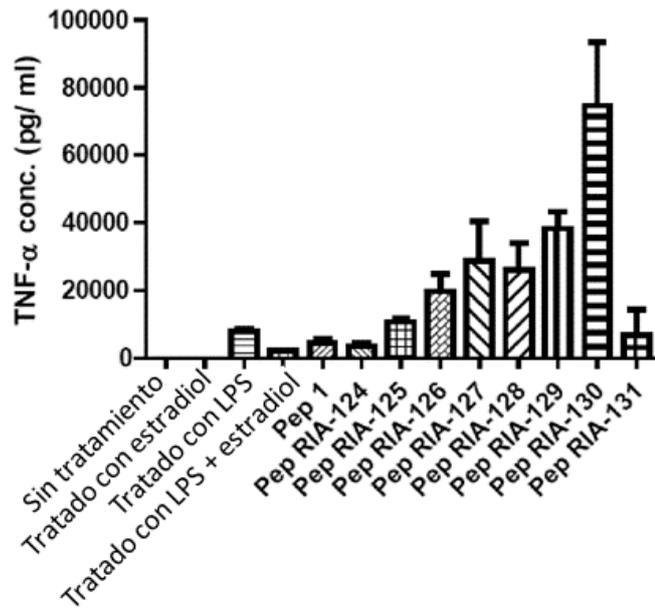


FIG. 18

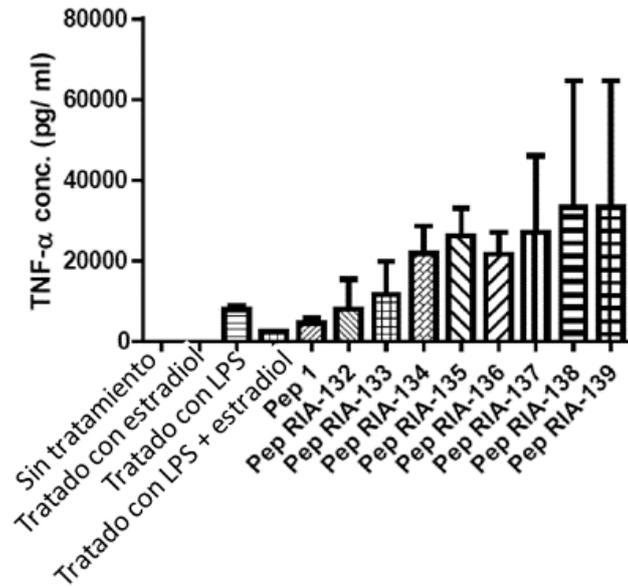


FIG. 19

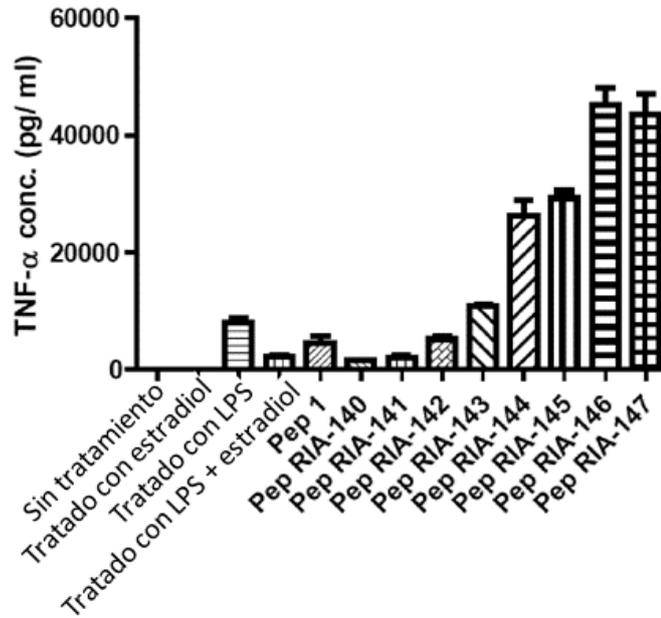


FIG. 20

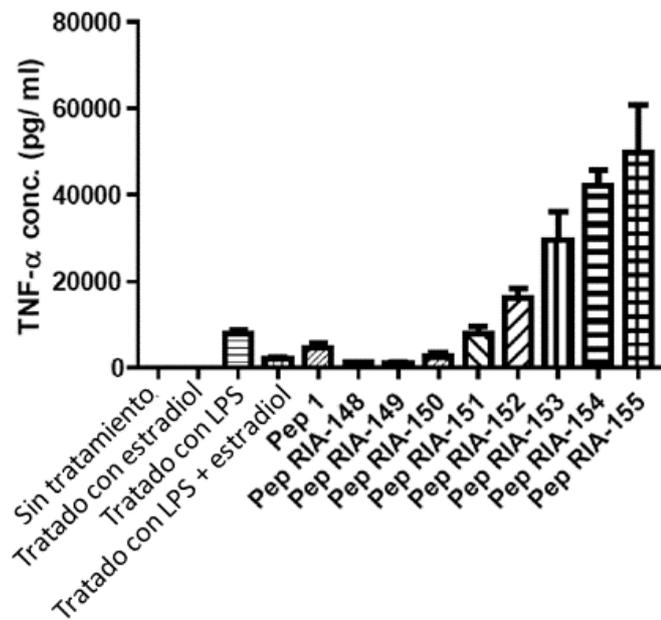


FIG. 21

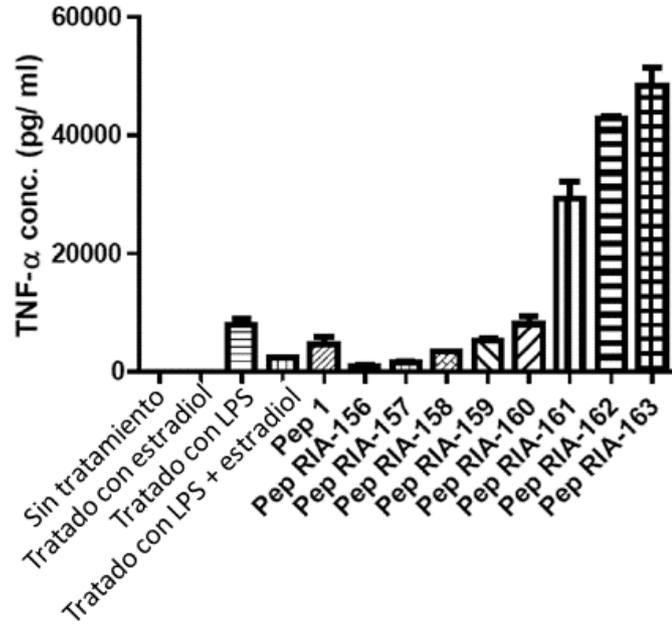


FIG. 22

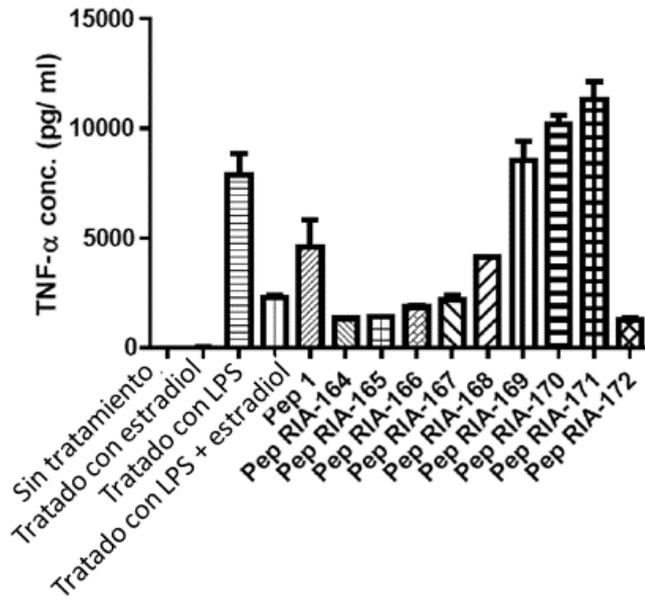


FIG. 23

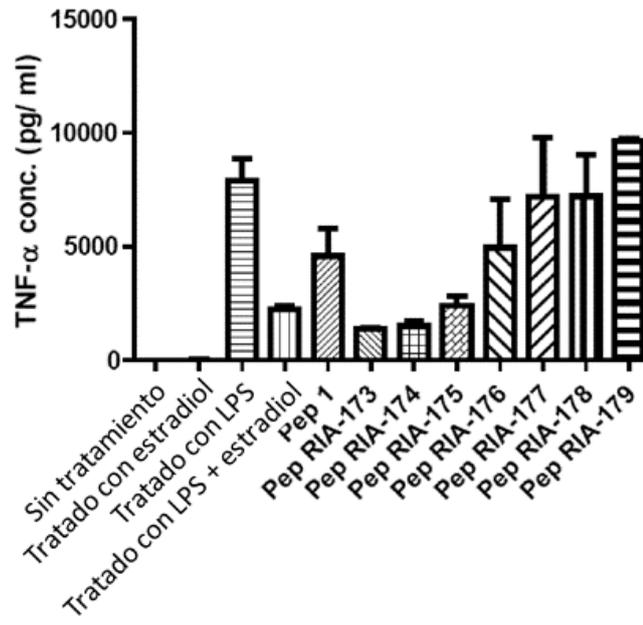


FIG. 24

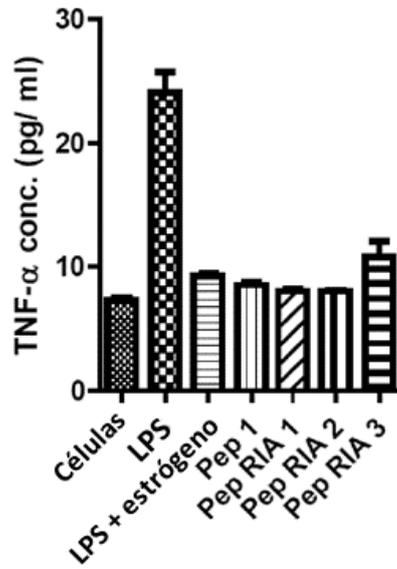


FIG. 25

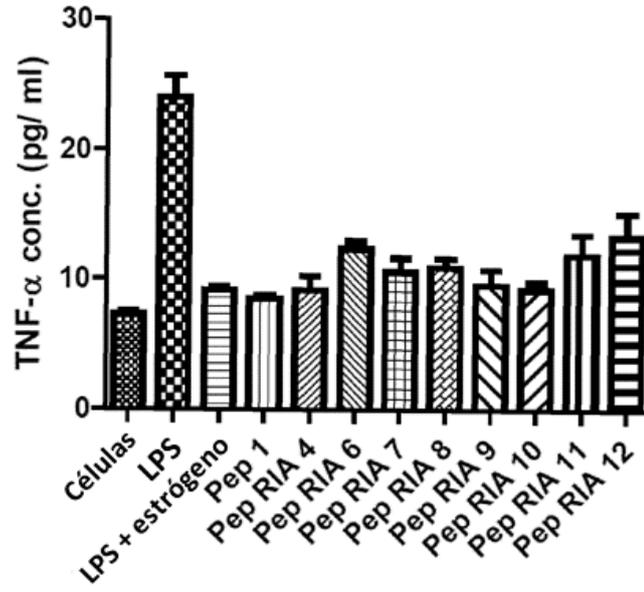


FIG. 26

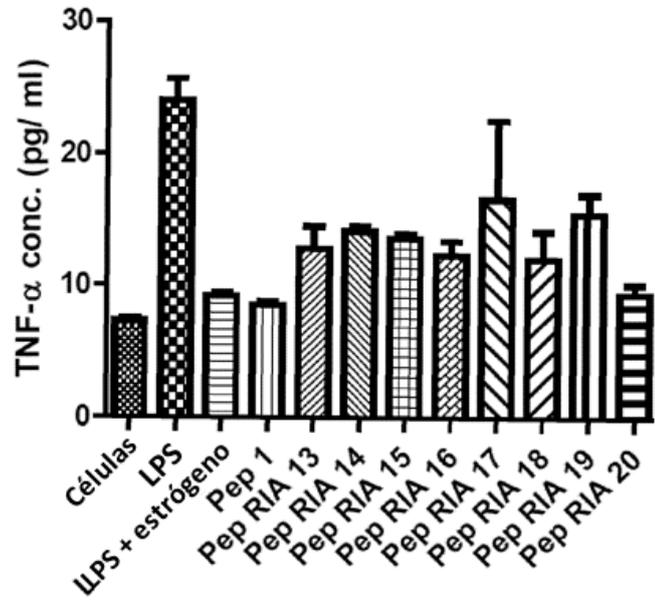


FIG. 27

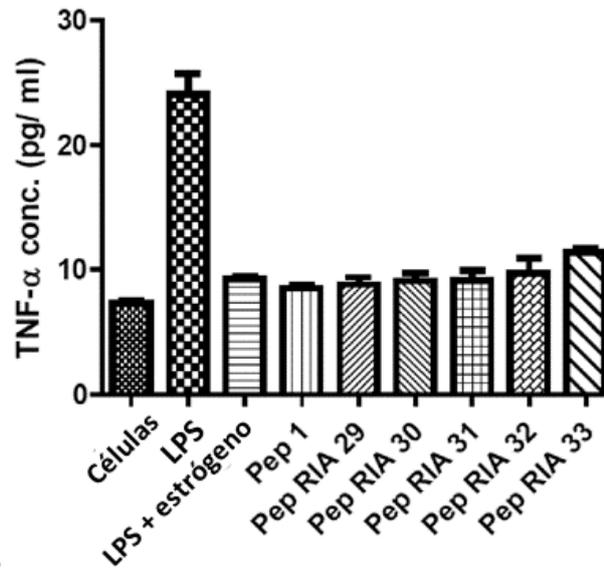
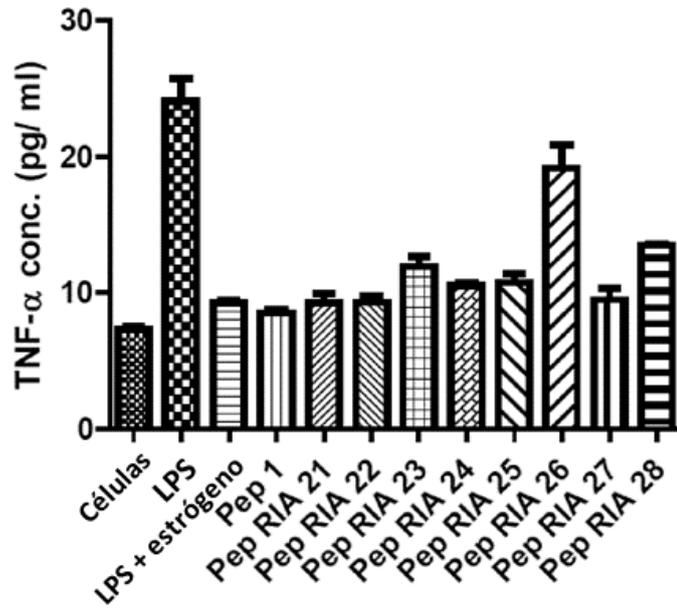


FIG. 28

FIG. 29

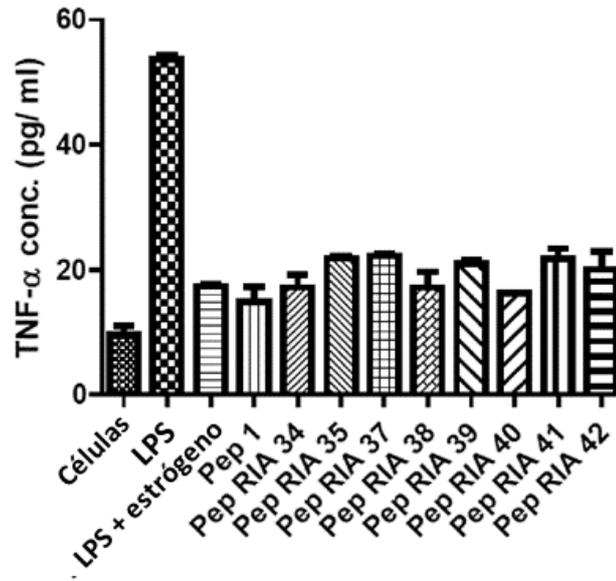


FIG. 30

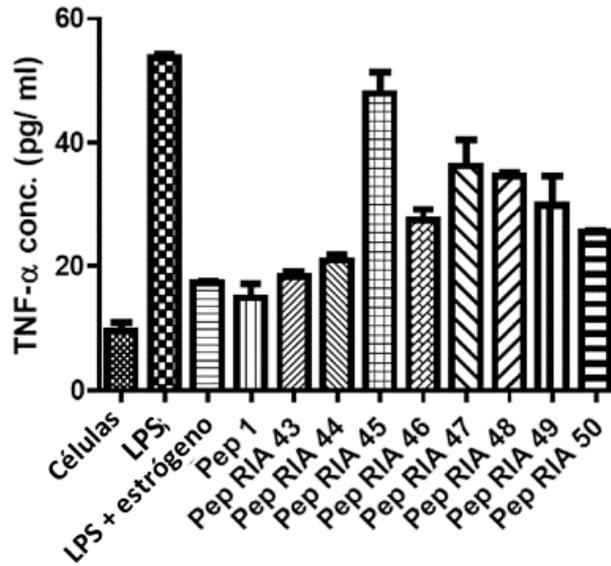


FIG. 31

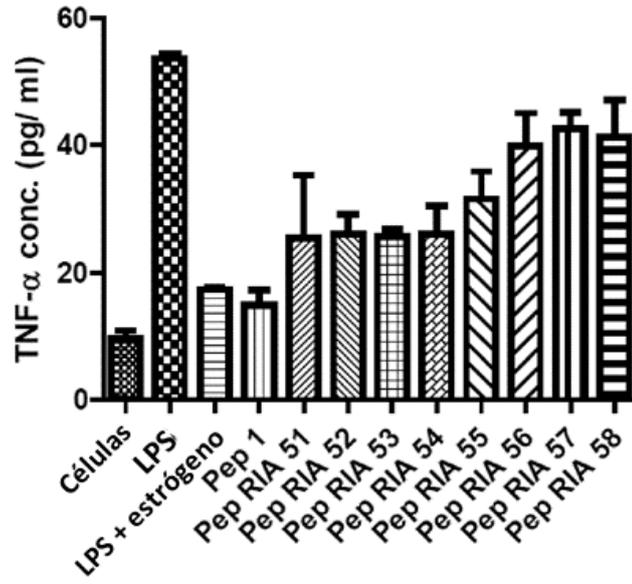


FIG. 32

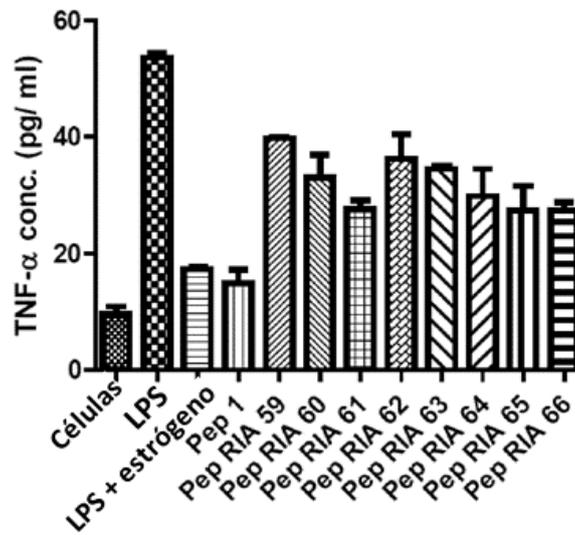


FIG. 33

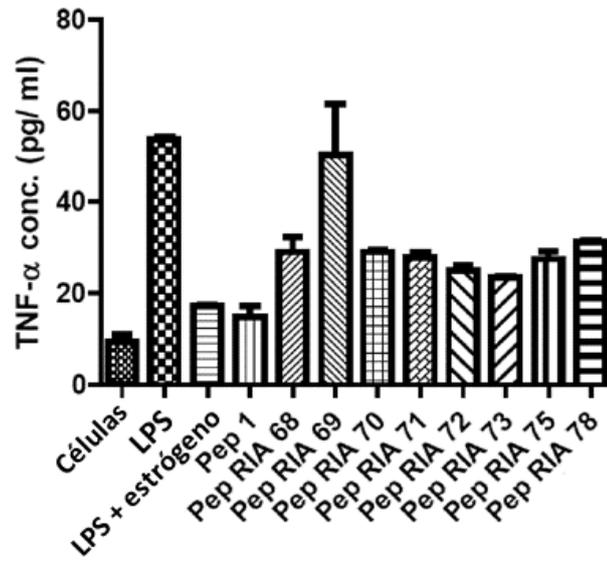


FIG. 34

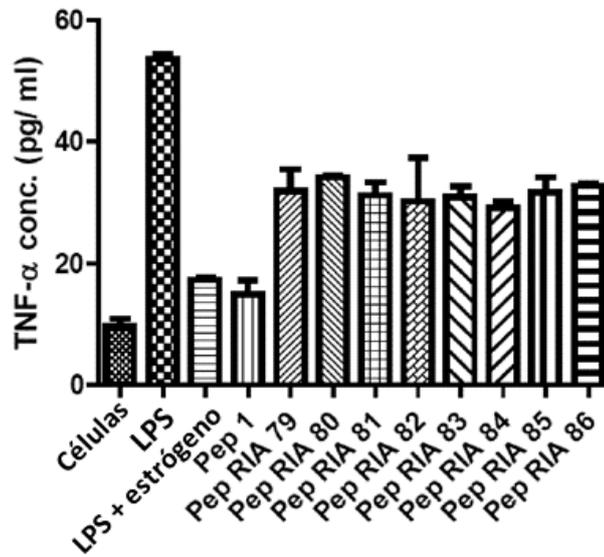


FIG. 35

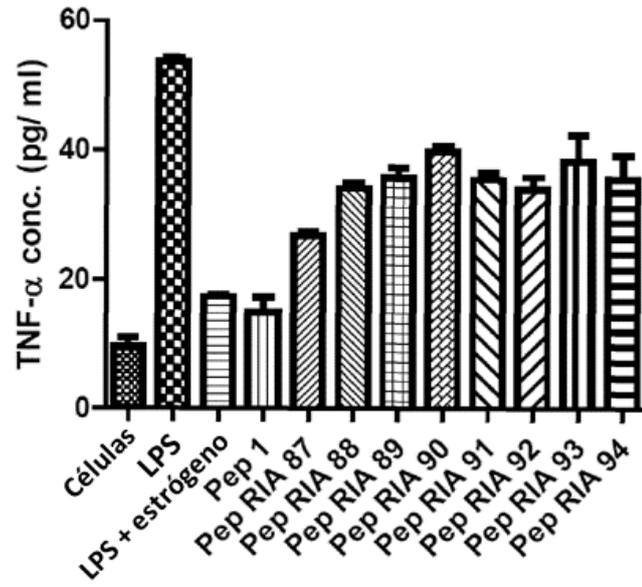


FIG. 36

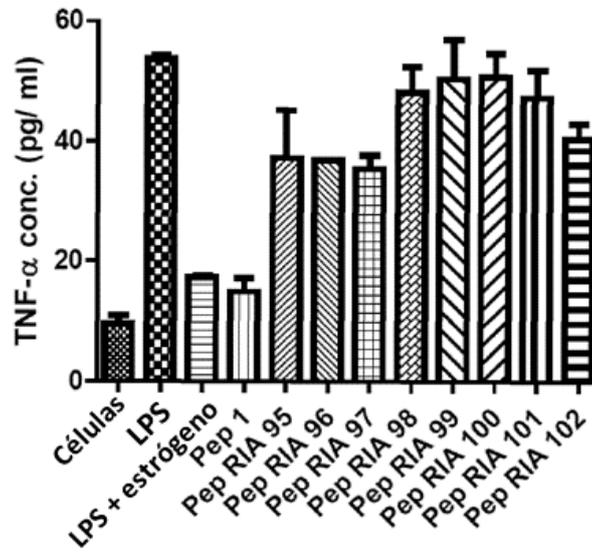


FIG. 37

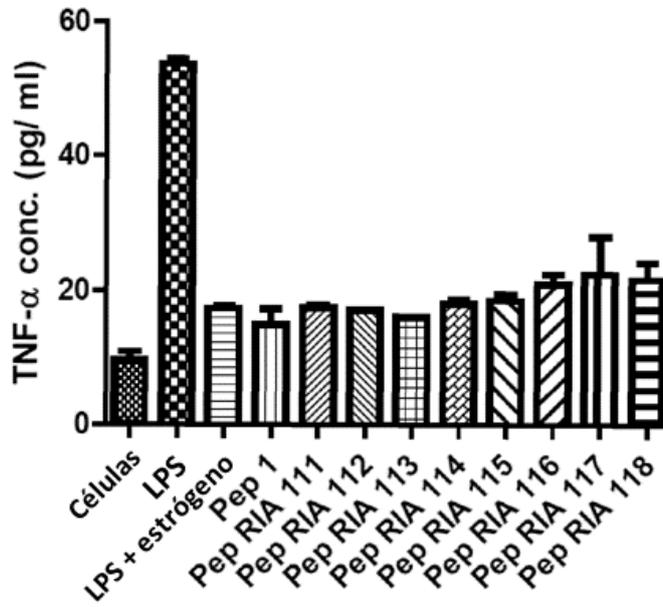
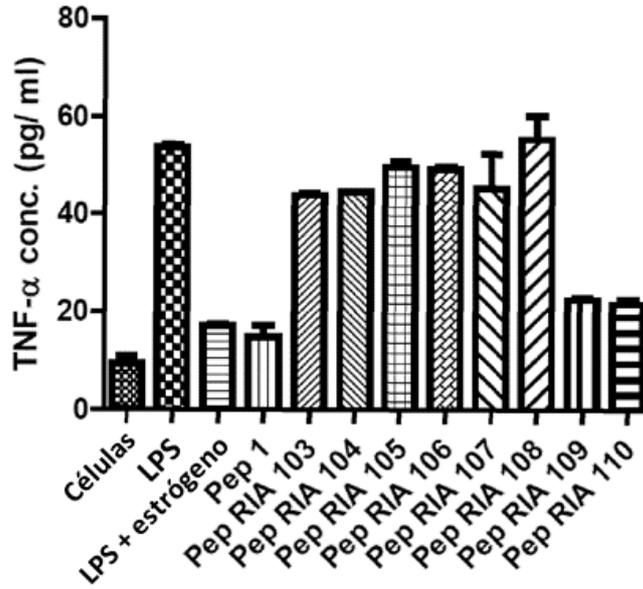


FIG. 38

FIG. 39

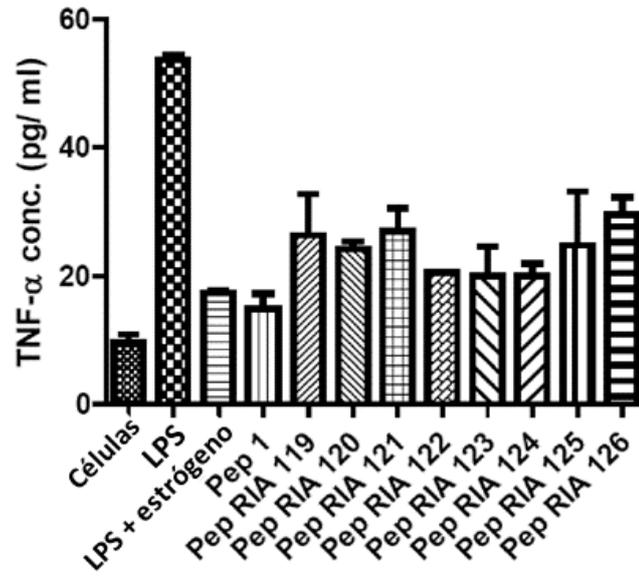


FIG. 40

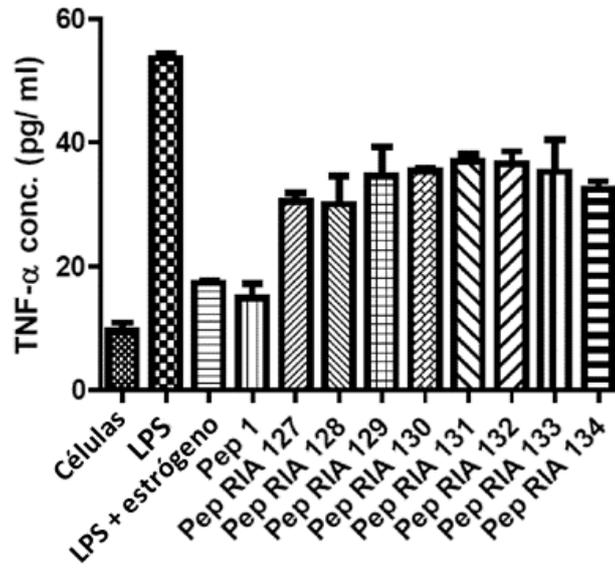


FIG. 41

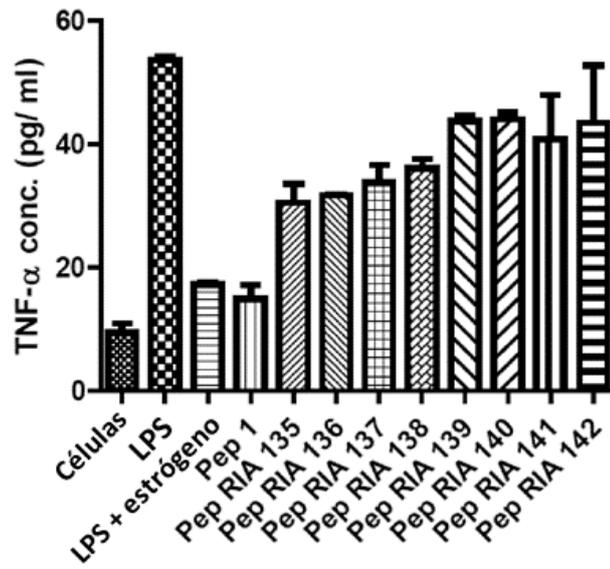


FIG. 42

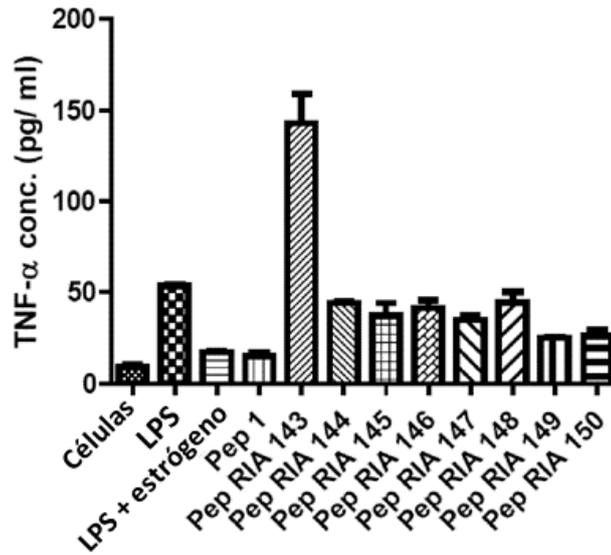


FIG. 43

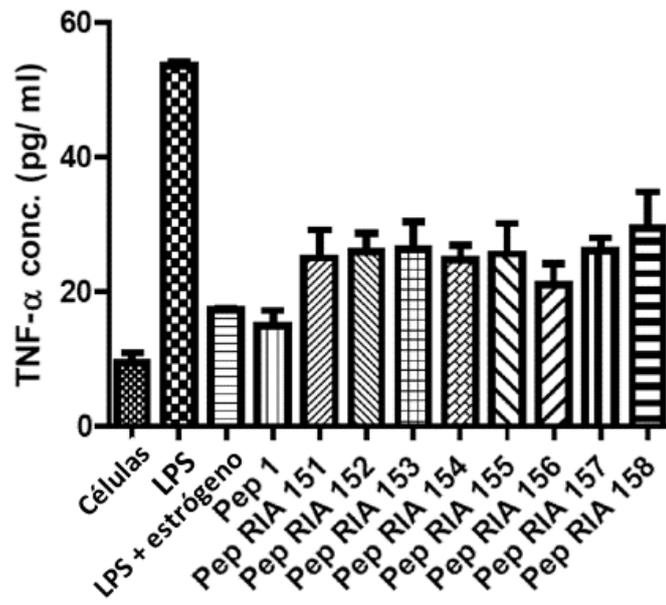


FIG. 44

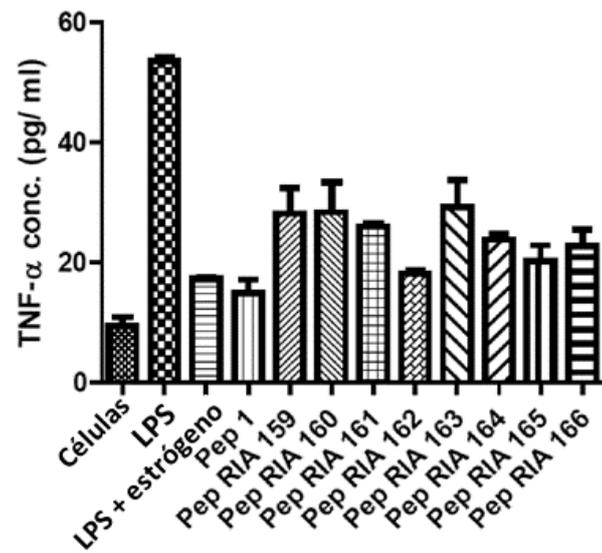


FIG. 45

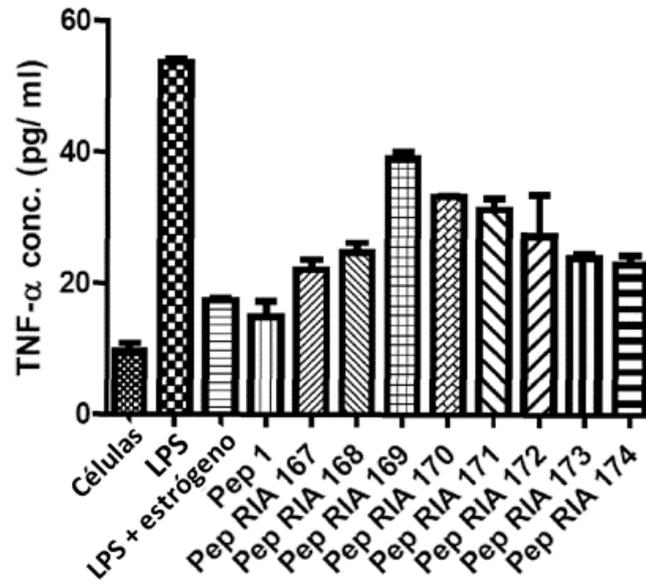


FIG.46

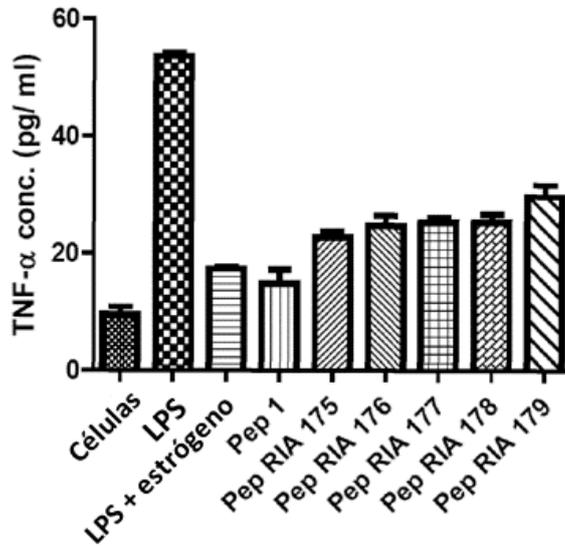


FIG.47

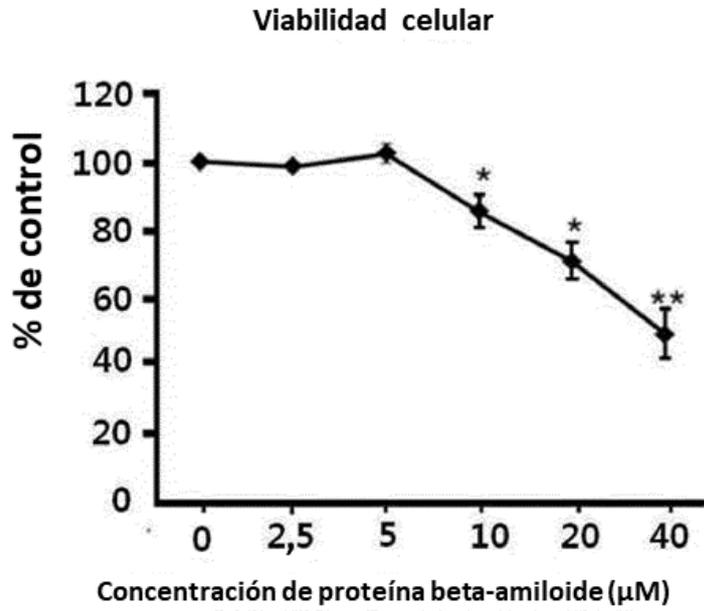


FIG.48

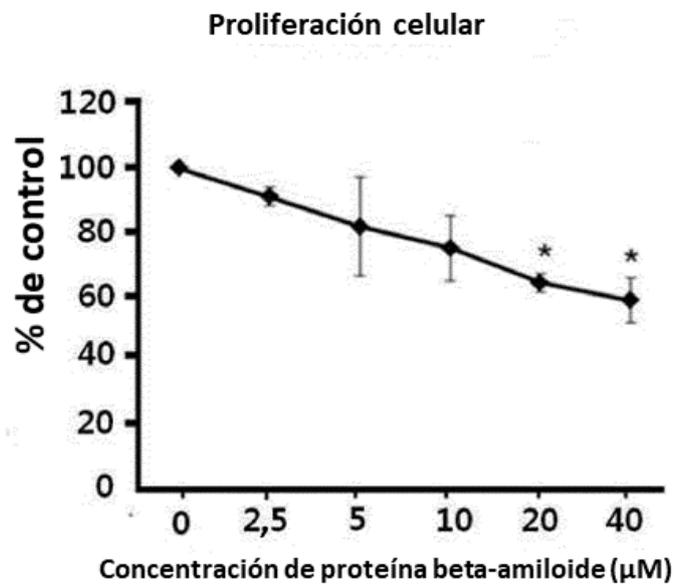


FIG.49

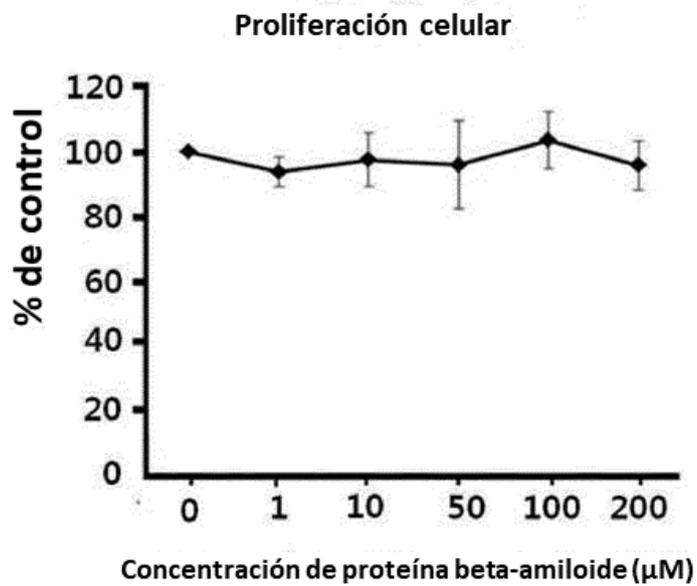
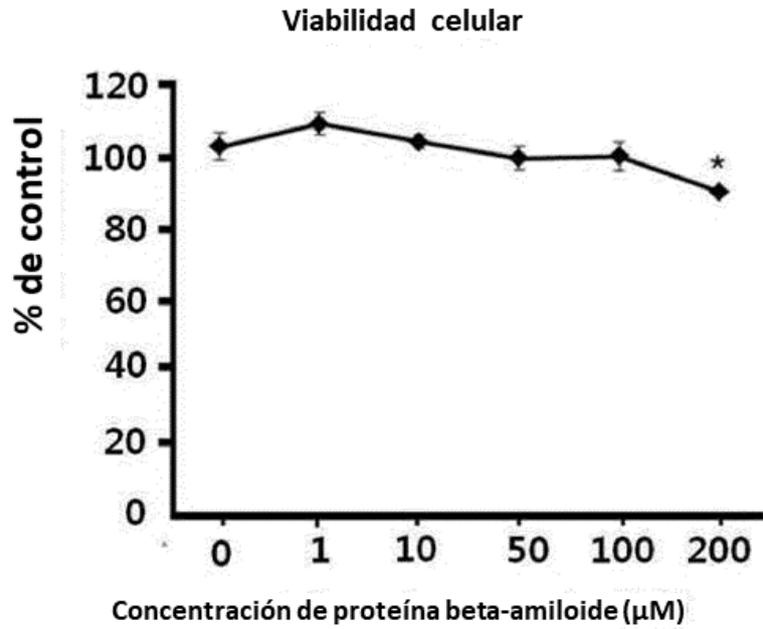


FIG.50

FIG.51

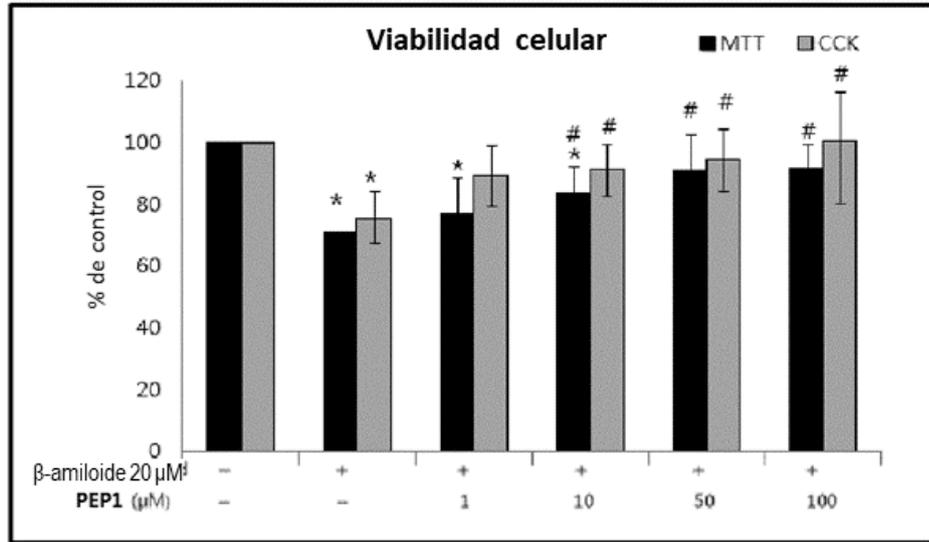


FIG.52

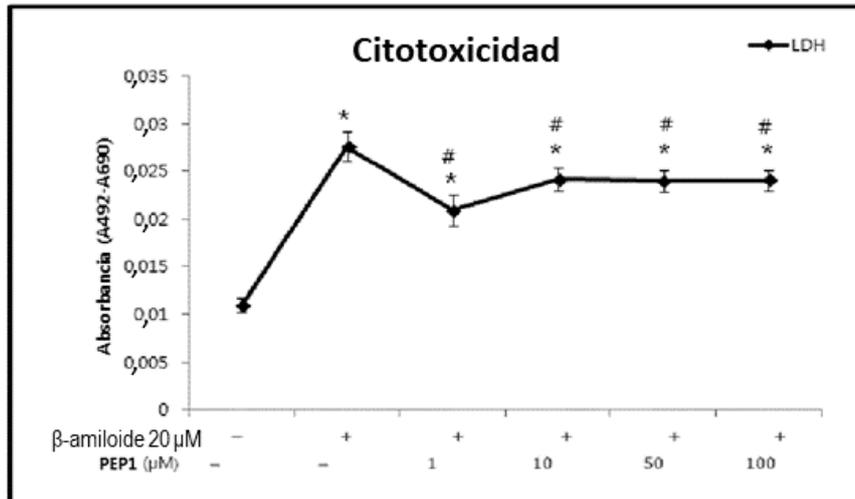


FIG.53

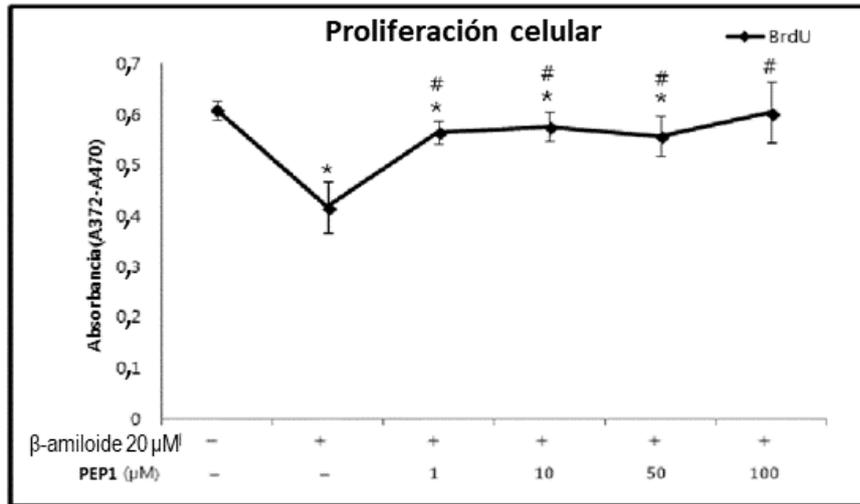


FIG.54

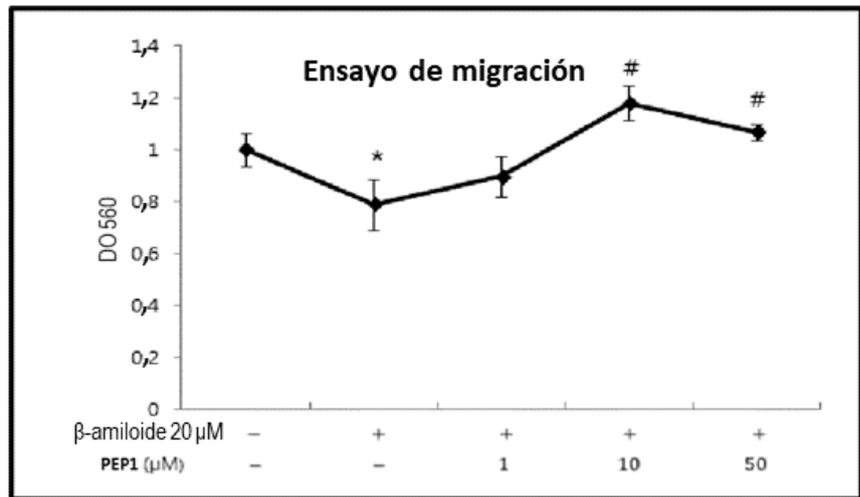


FIG.55

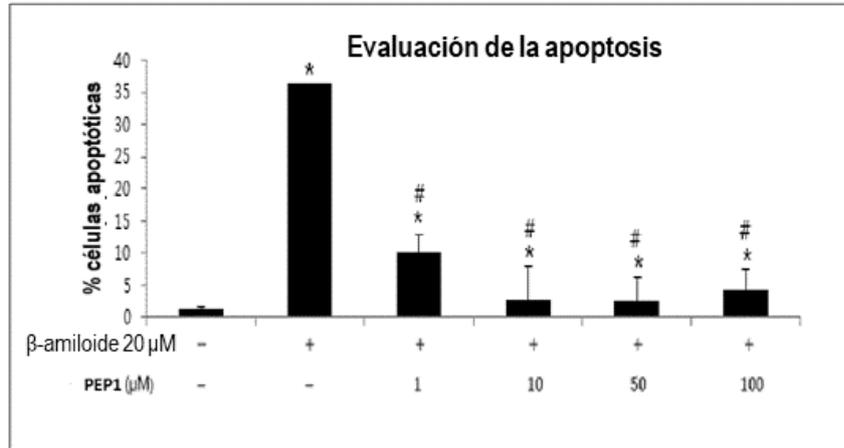


FIG.56

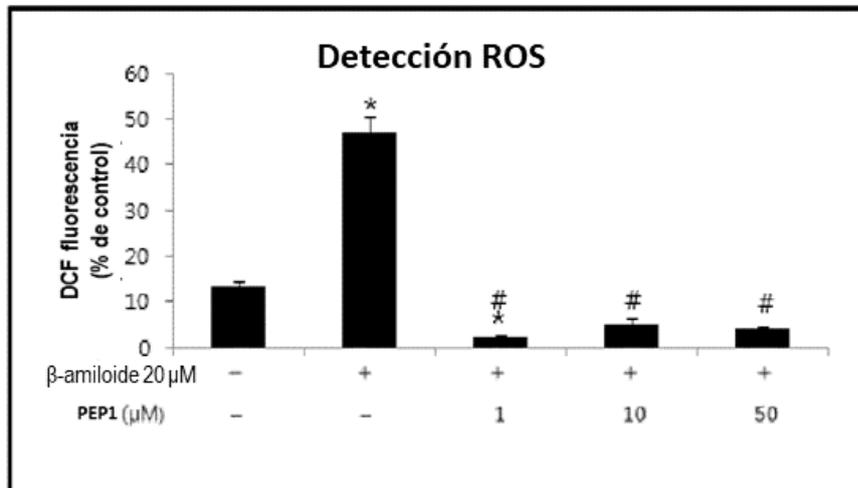


FIG.57

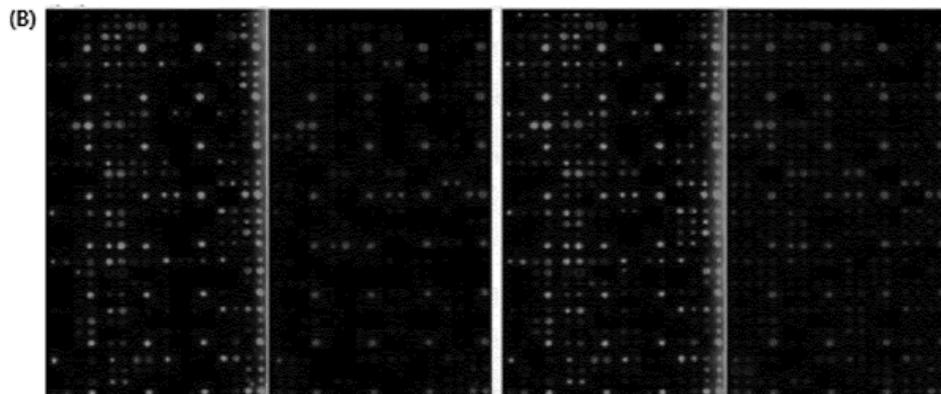
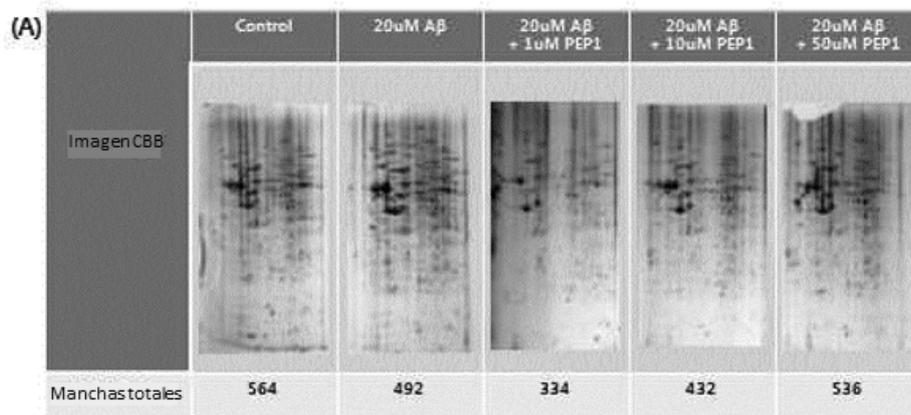
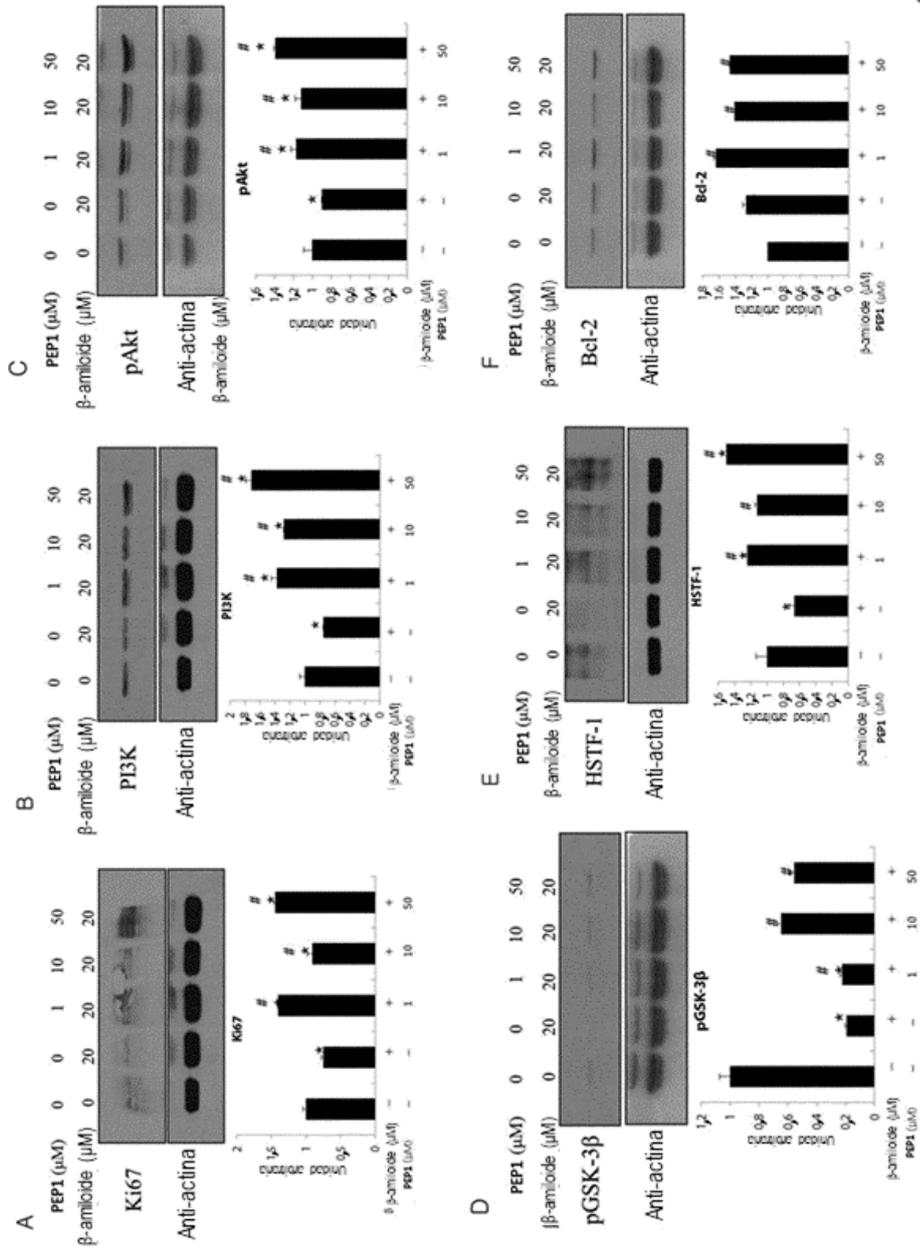


FIG.58



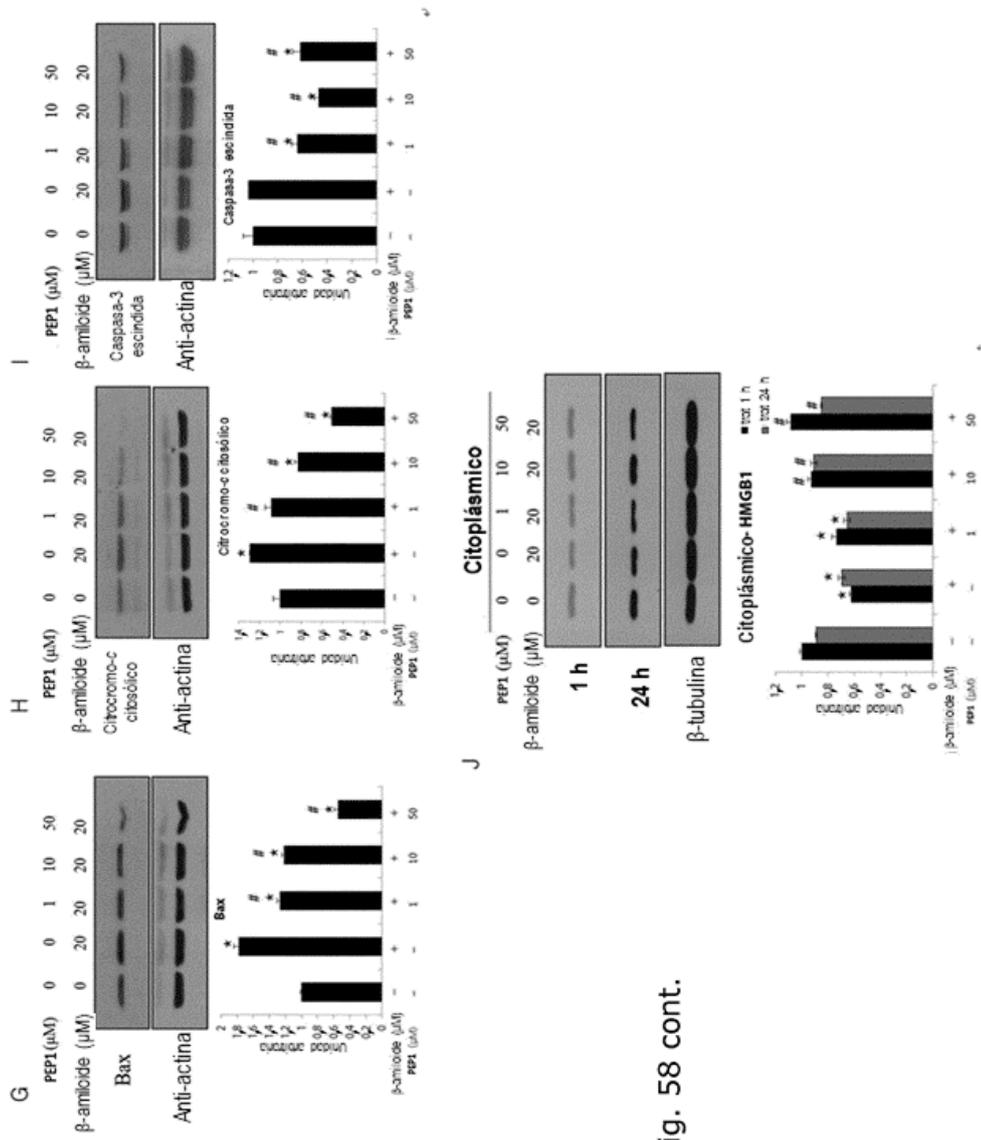


Fig. 58 cont.

FIG.59

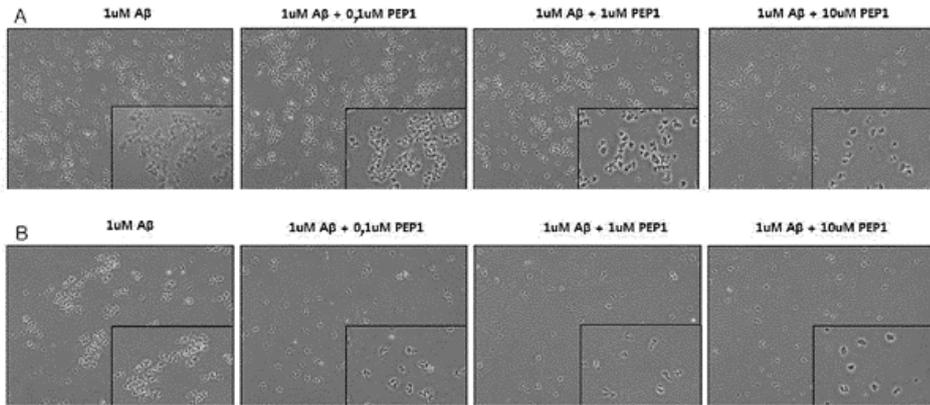


FIG. 60

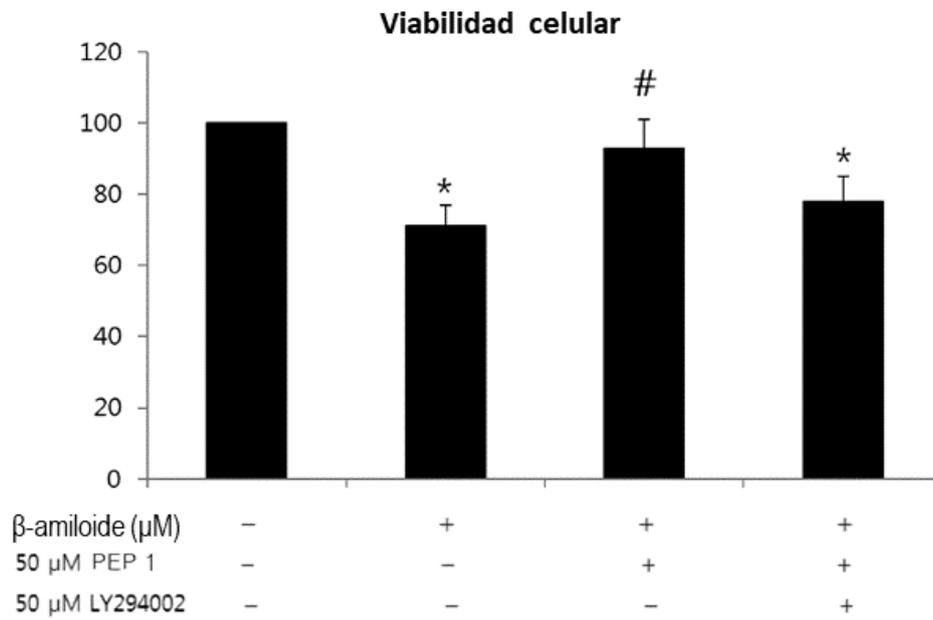


FIG. 61

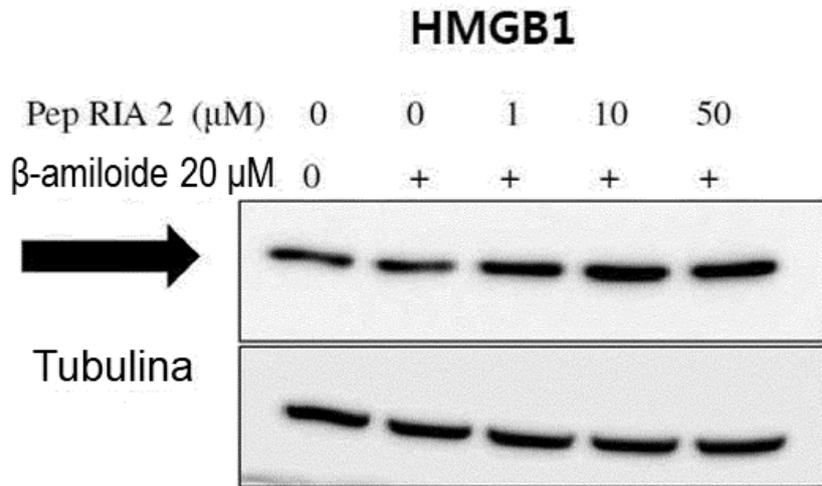


FIG. 62

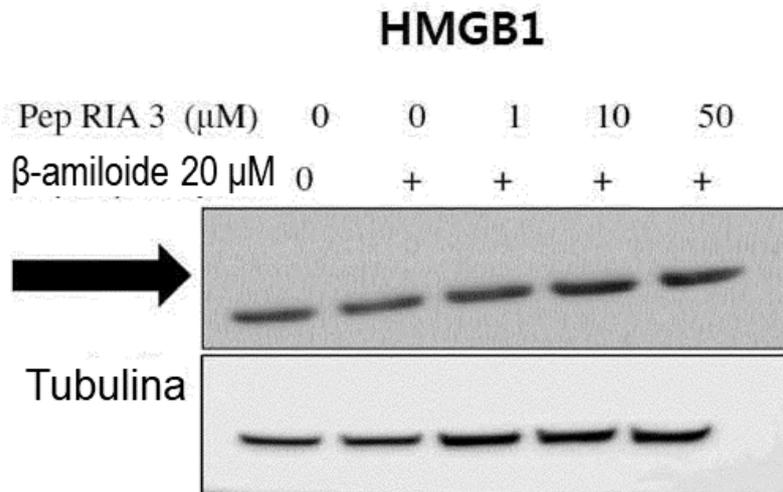


FIG. 63

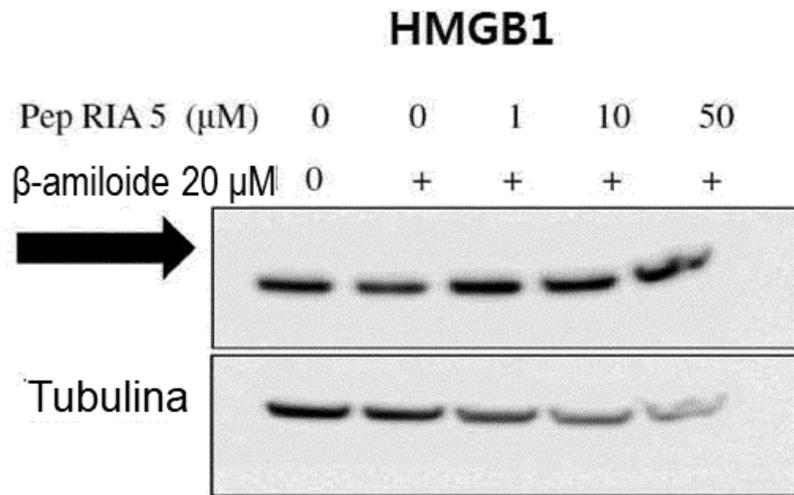


FIG. 64

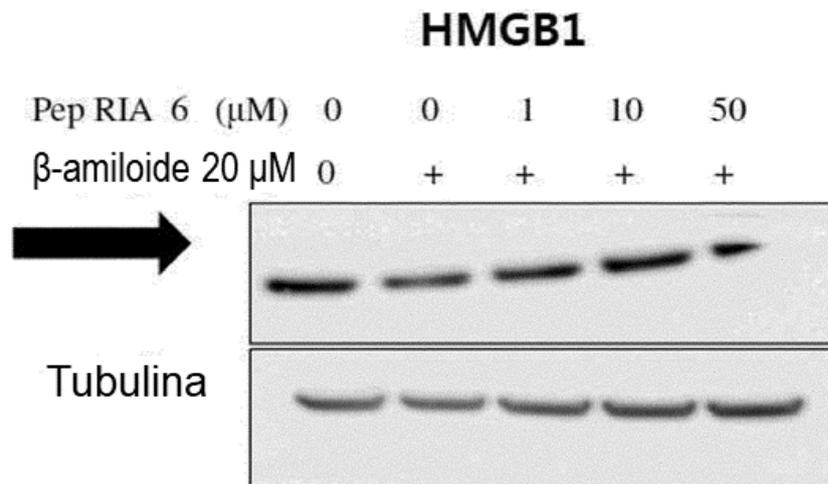


FIG. 65

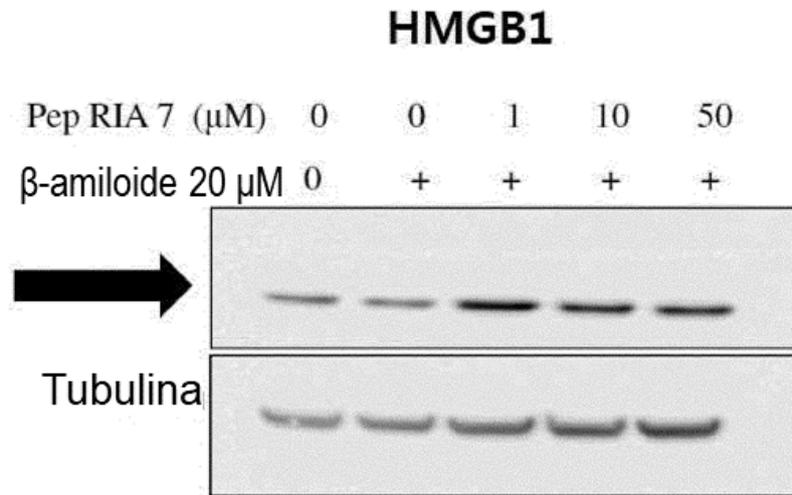


FIG. 66

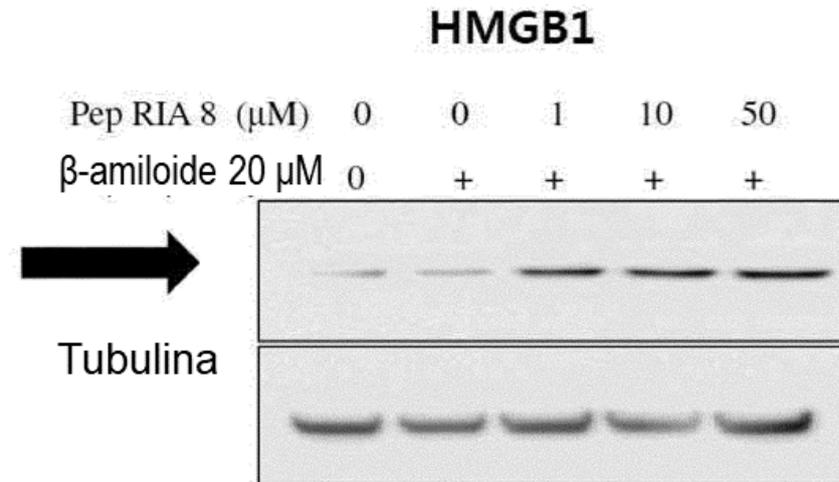


FIG. 67

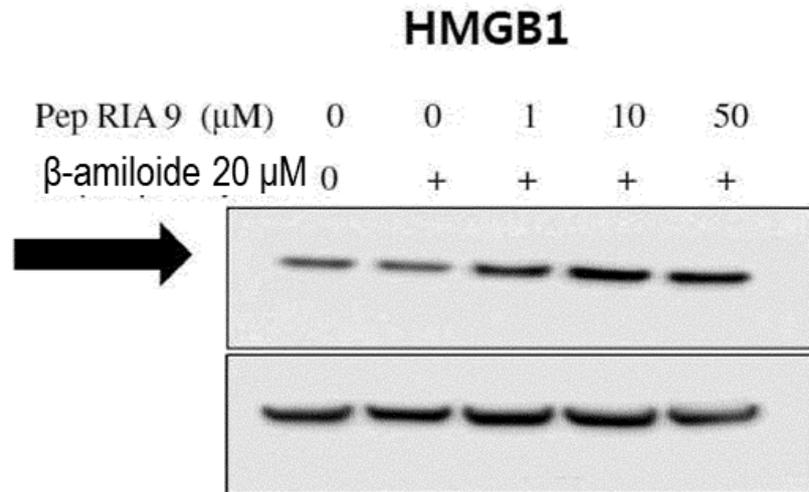


FIG. 68

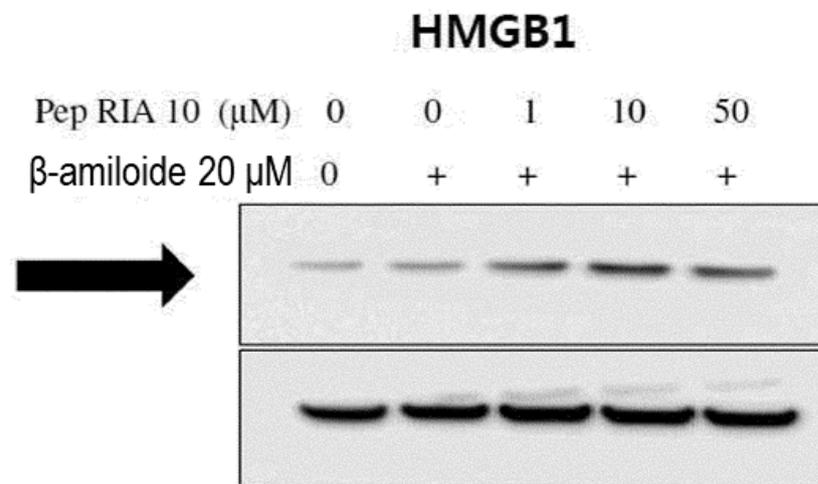


FIG. 69

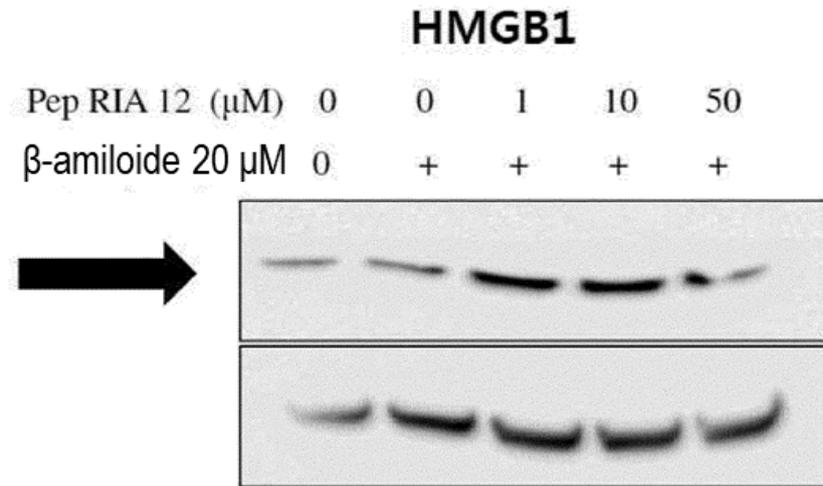


FIG. 70

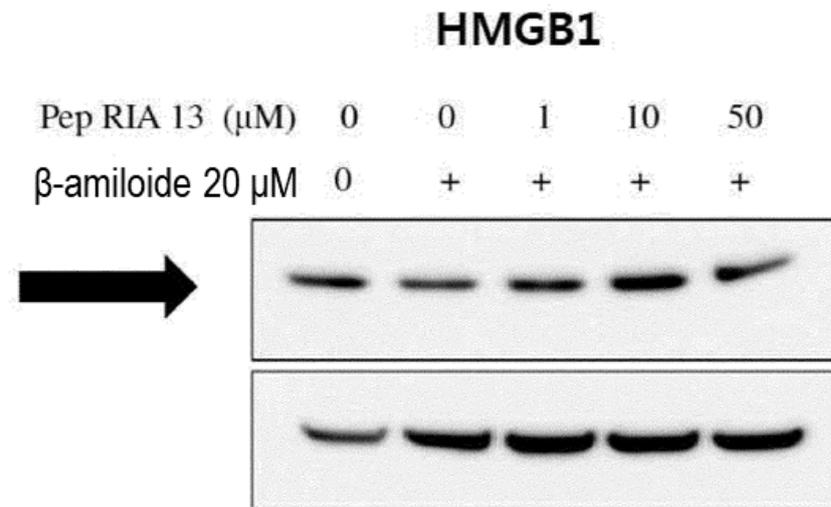


FIG. 71

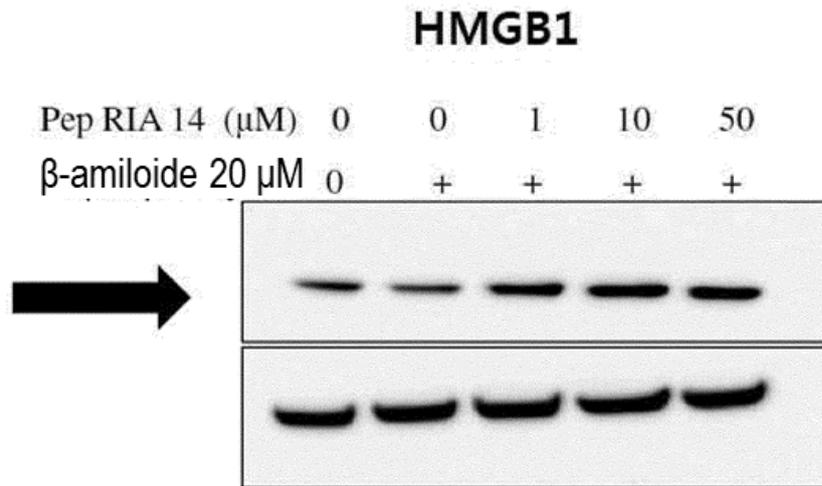


FIG. 72

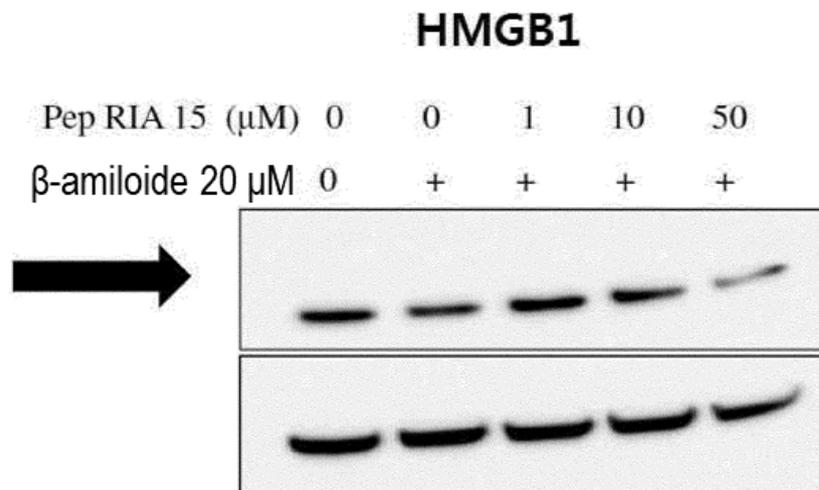


FIG. 73

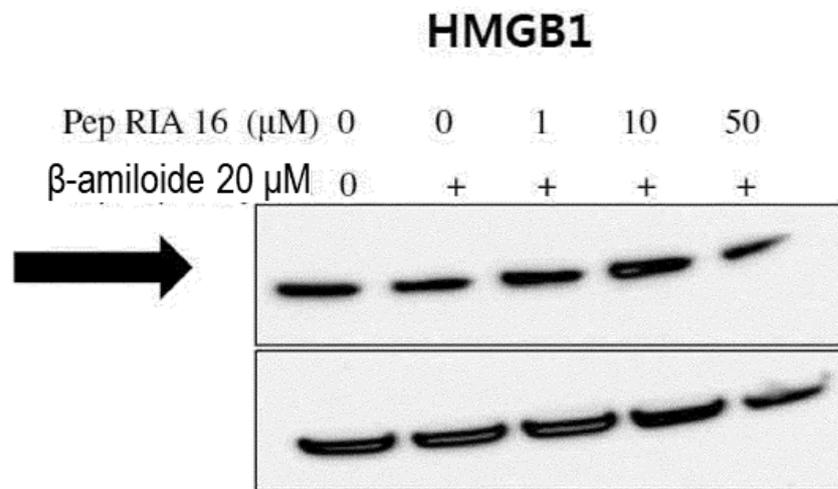


FIG. 74

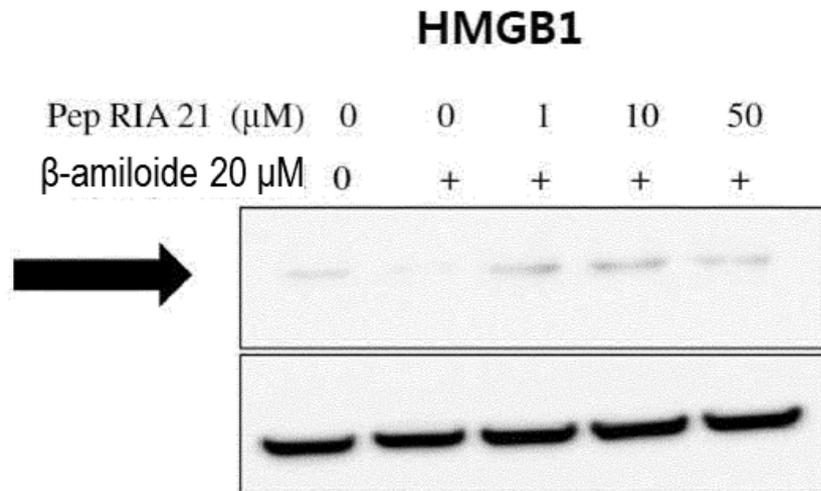


FIG. 75

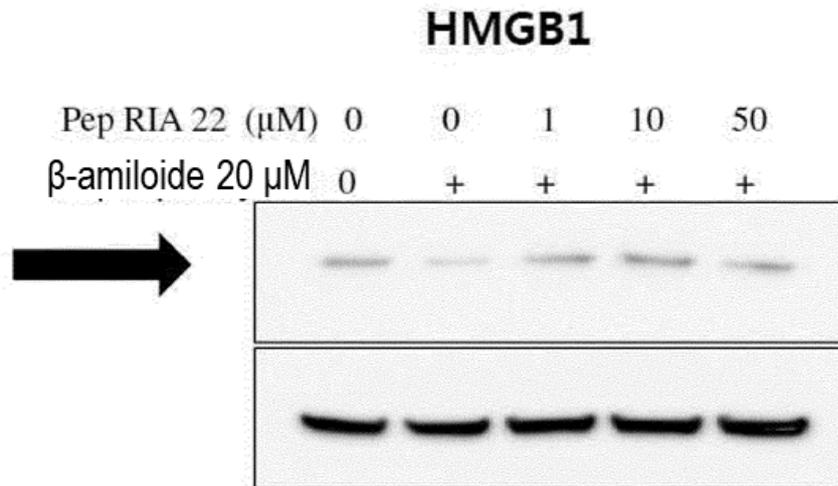


FIG. 76

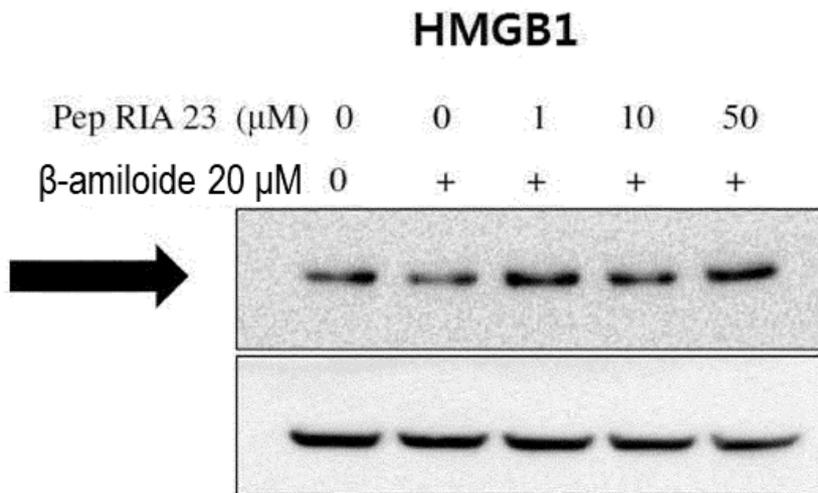


FIG. 77

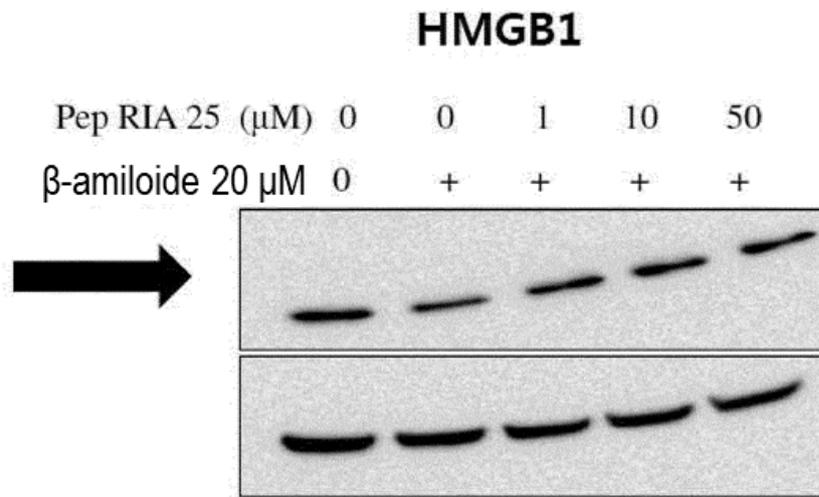


FIG. 78

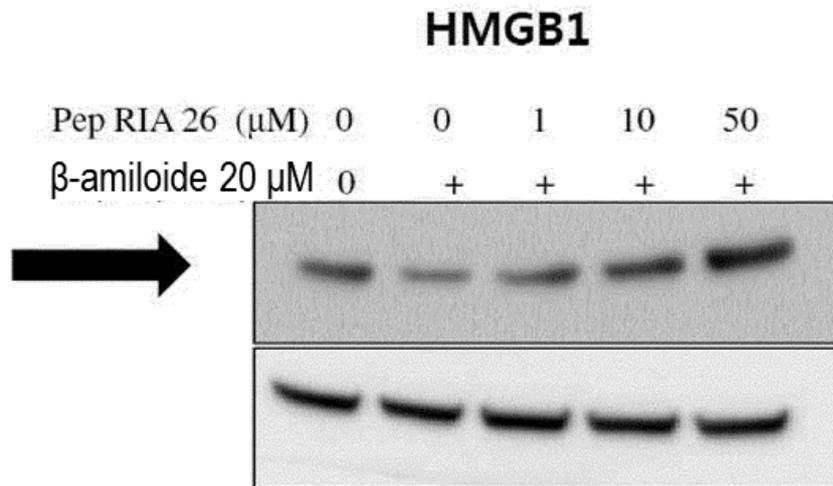


FIG. 79

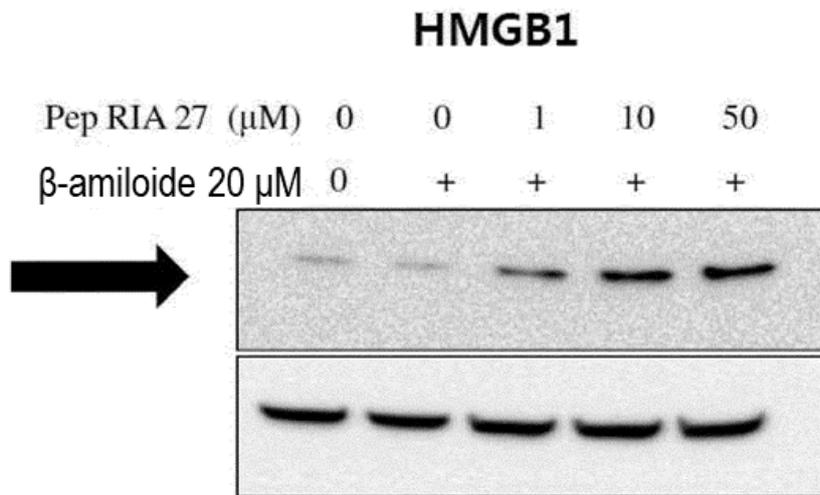


FIG. 80

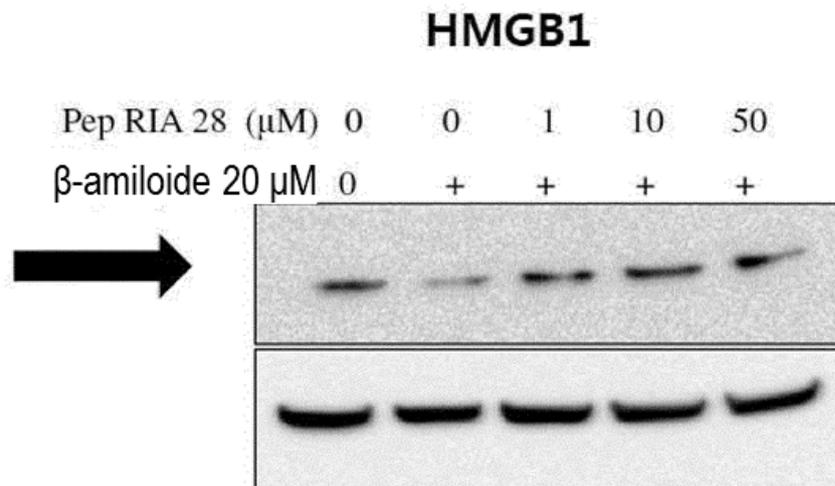


FIG. 81

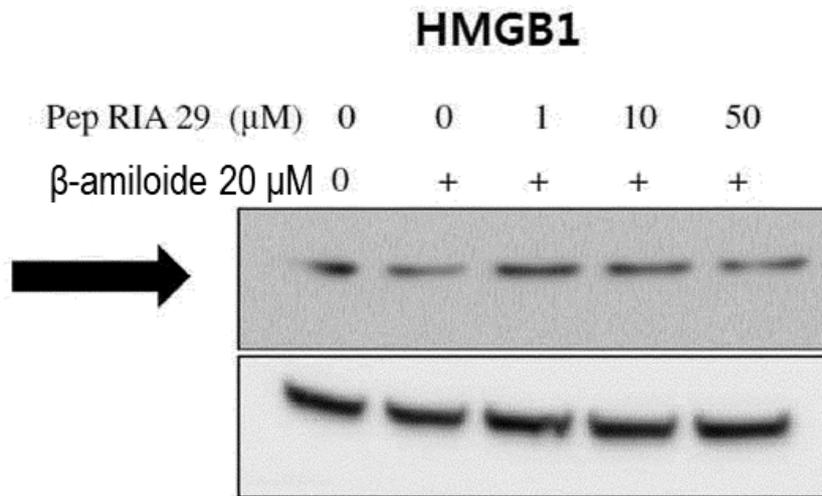


FIG. 82

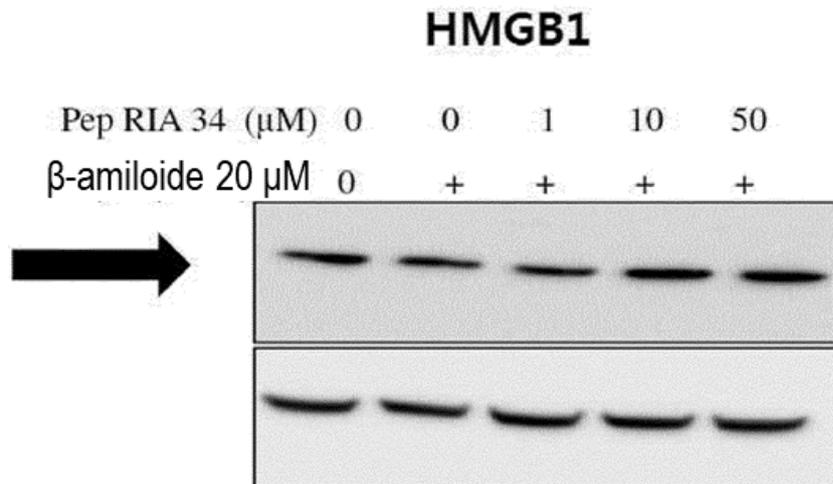


FIG. 83

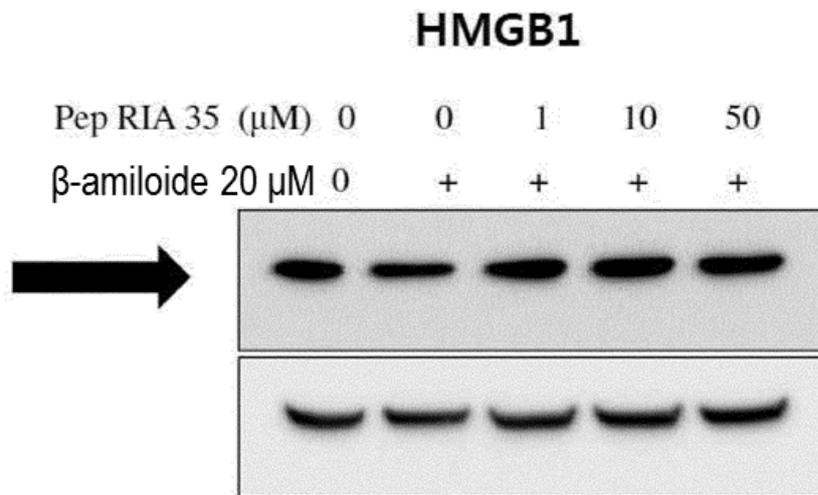


FIG. 84

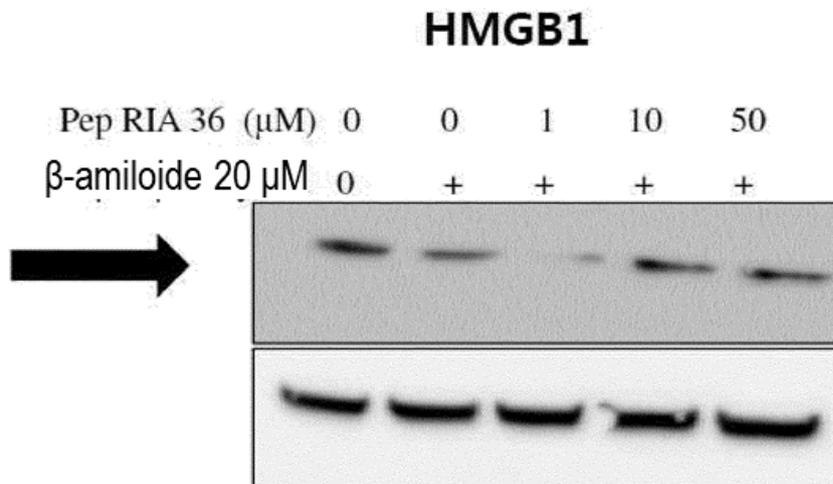


FIG. 85

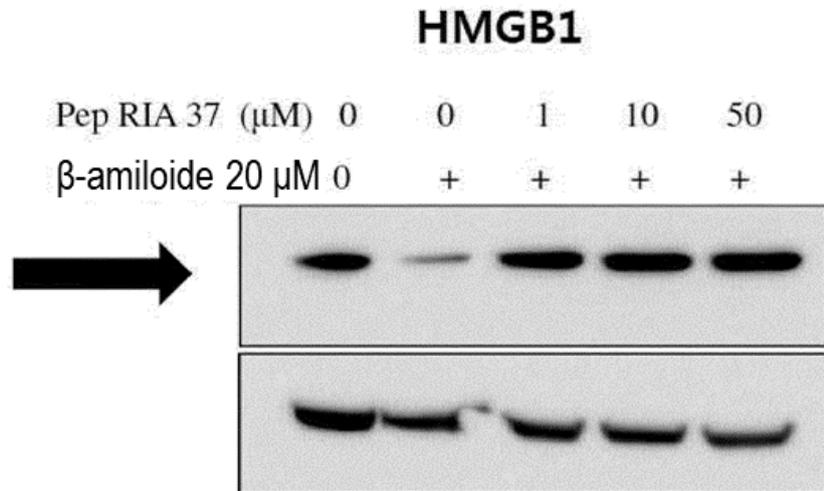


FIG. 86

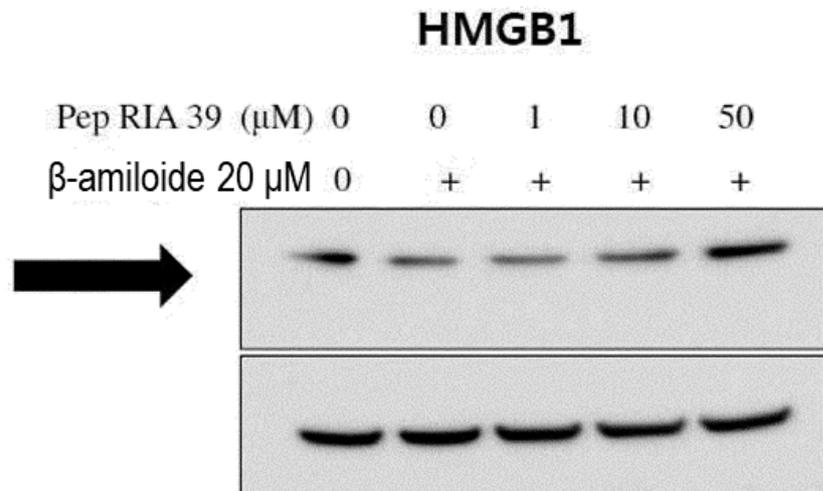


FIG. 87

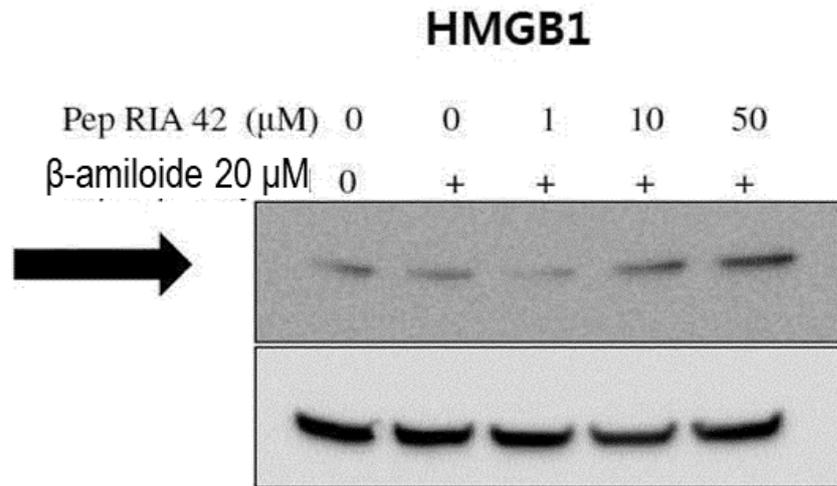


FIG. 88

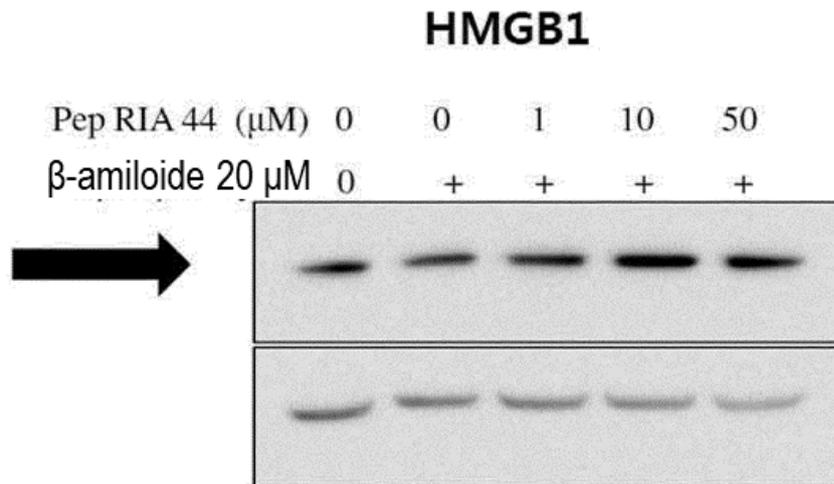


FIG. 89

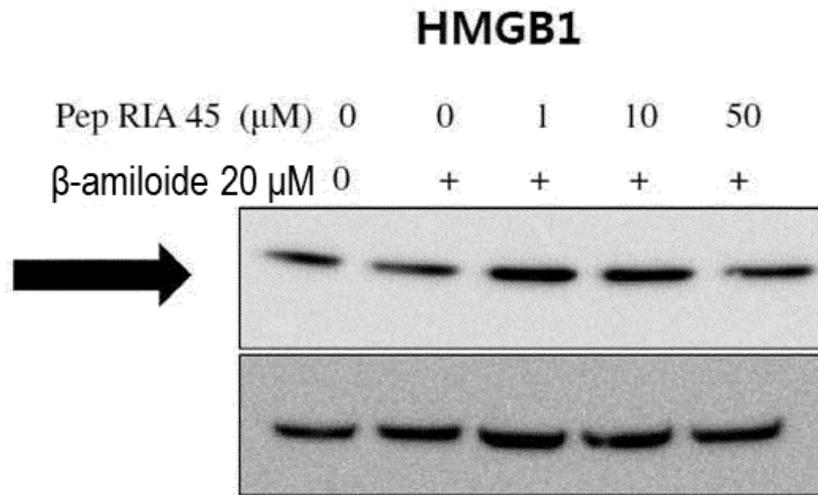


FIG. 90

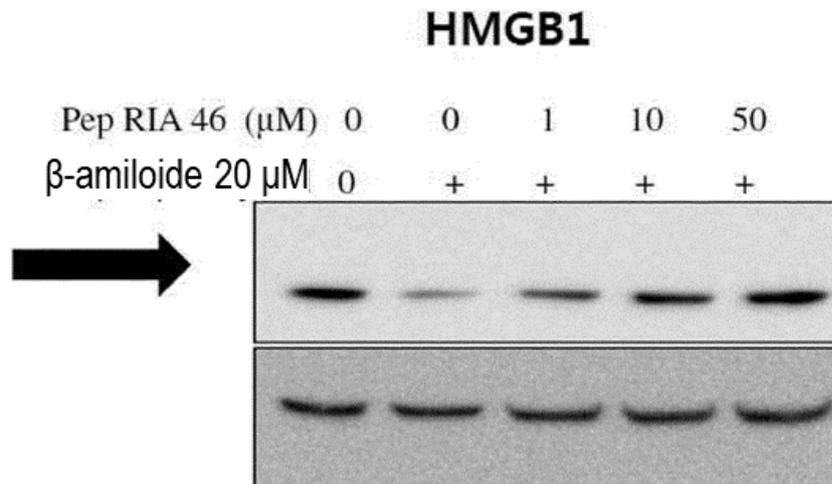


FIG. 91

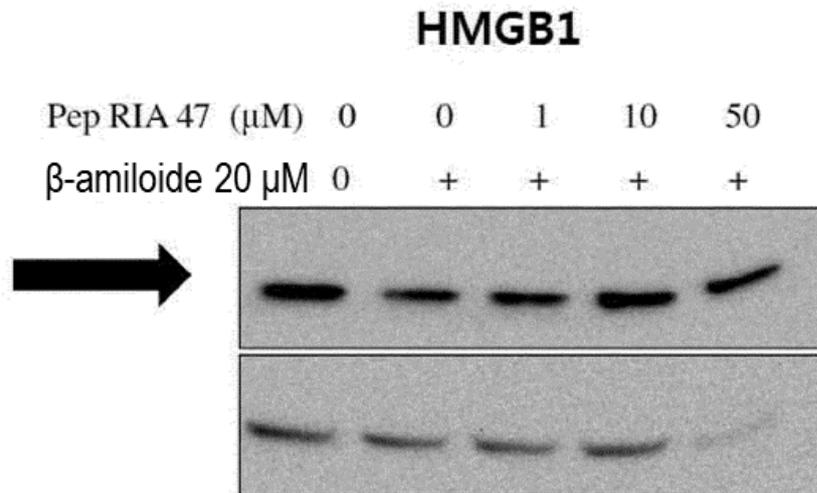


FIG. 92

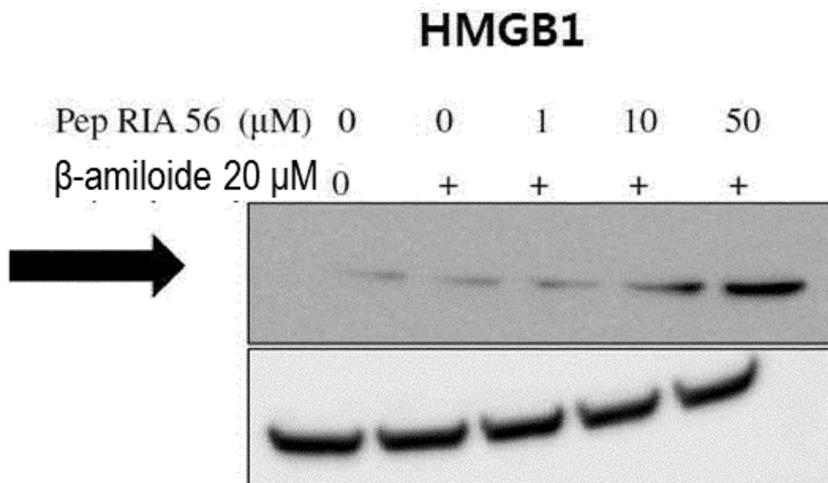


FIG. 93

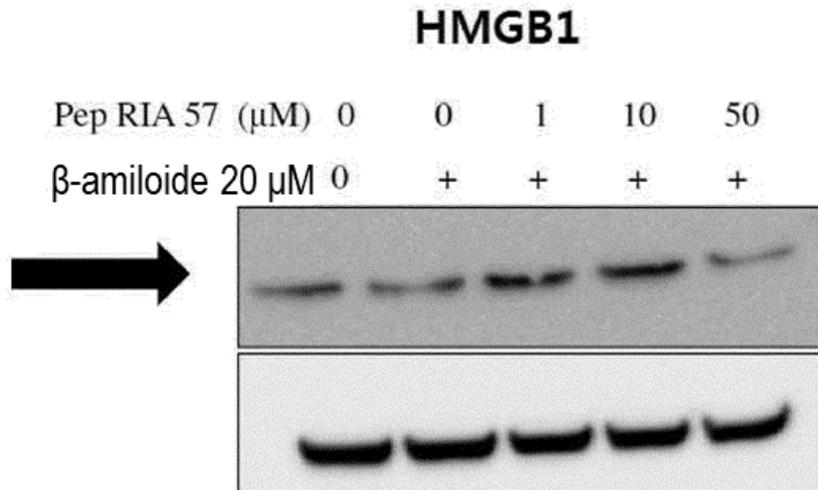


FIG. 94

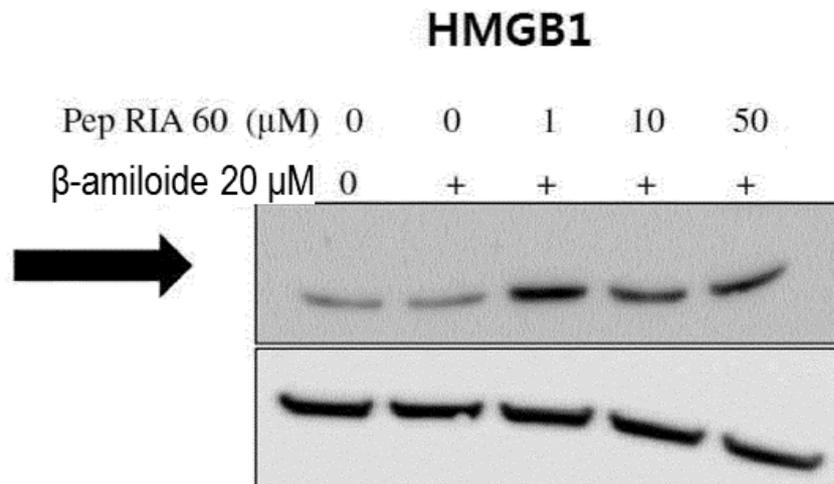


FIG. 95

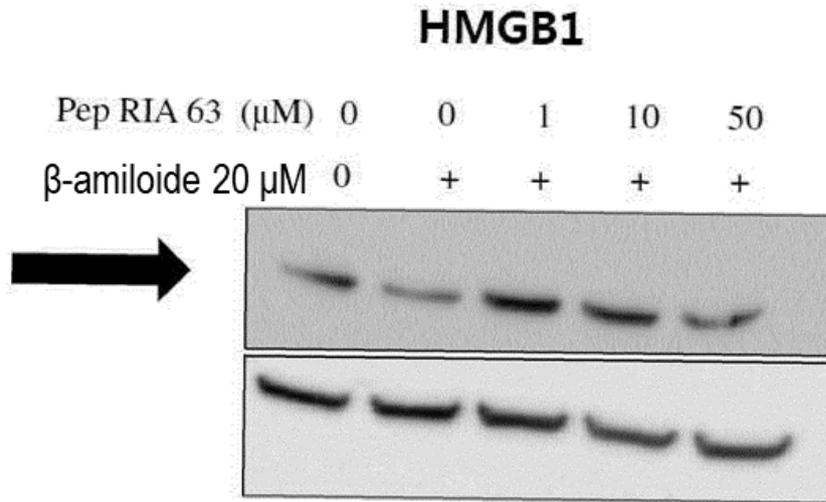


FIG. 96

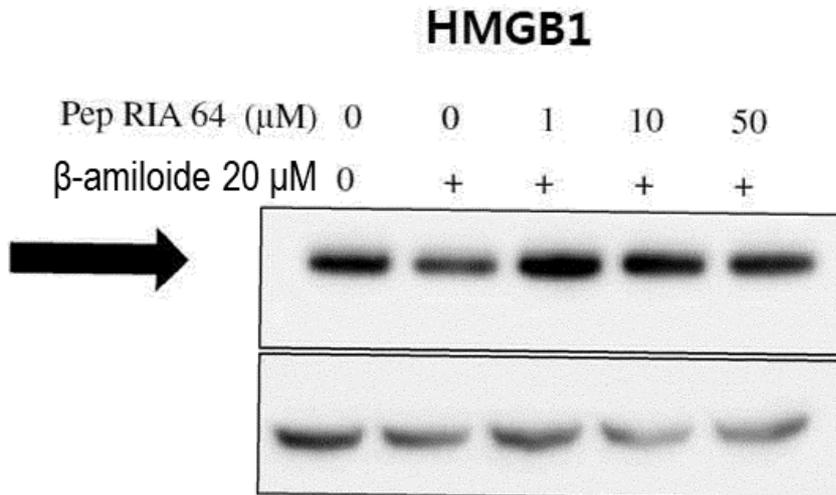


FIG. 97

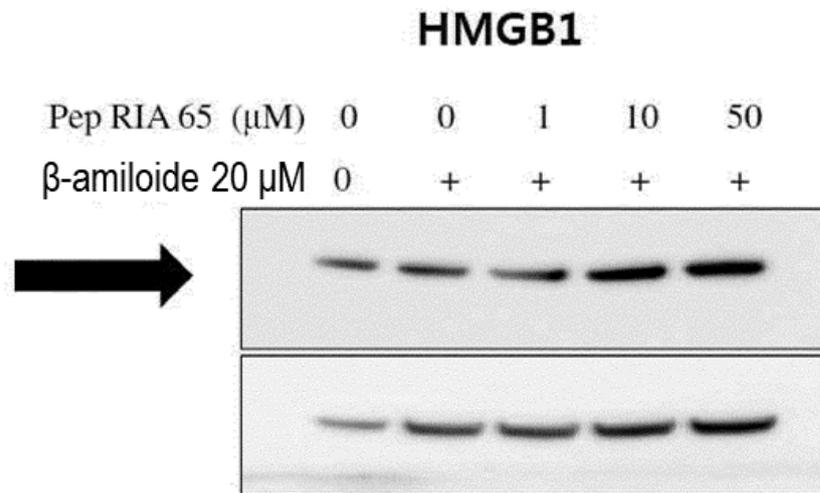


FIG. 98

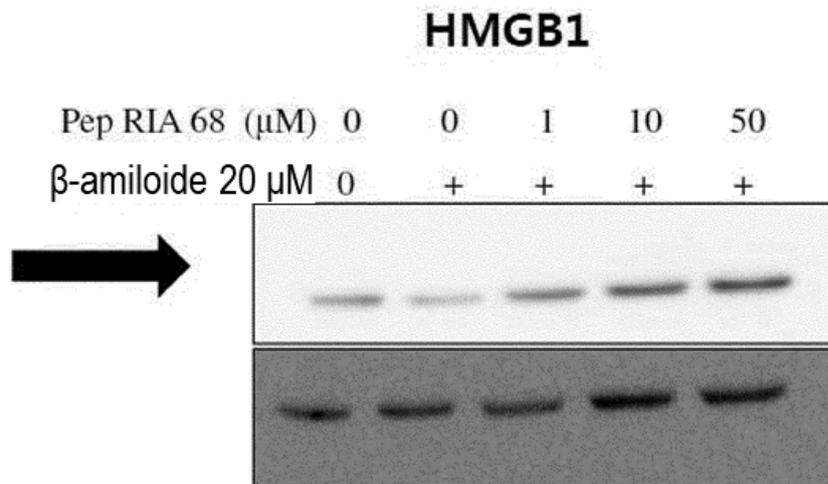


FIG. 99

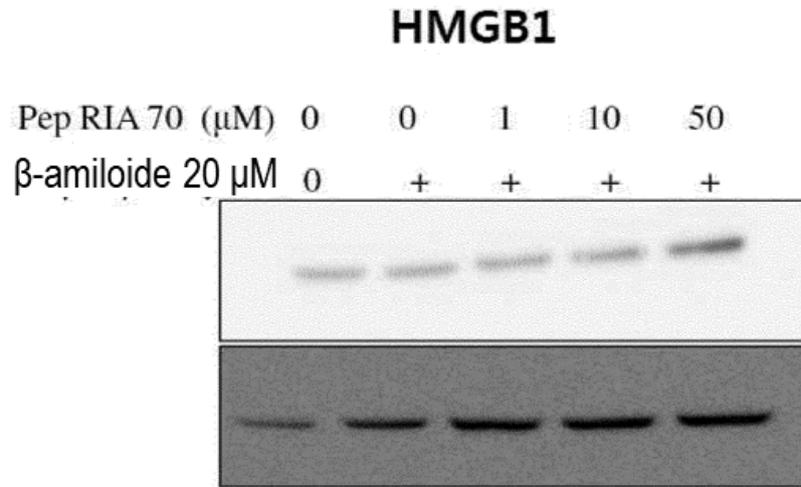


FIG. 100

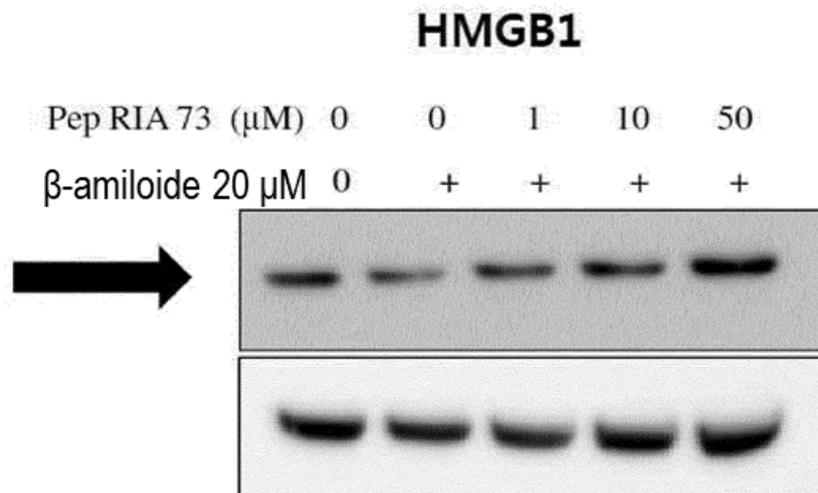


FIG. 101

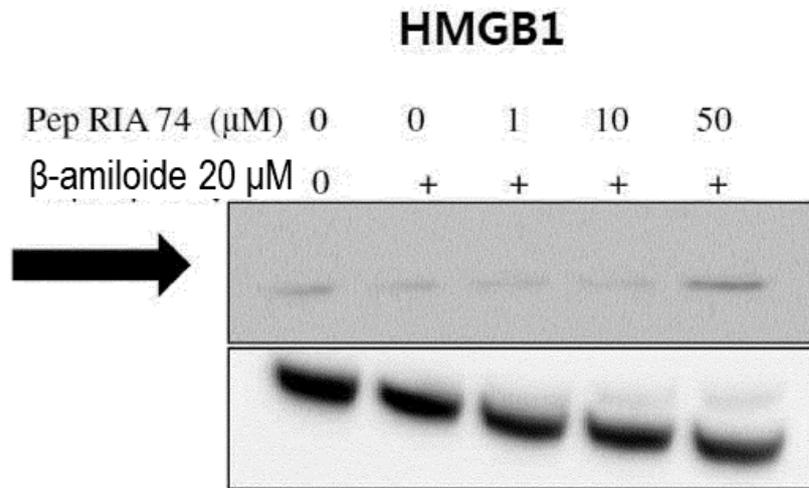


FIG. 102

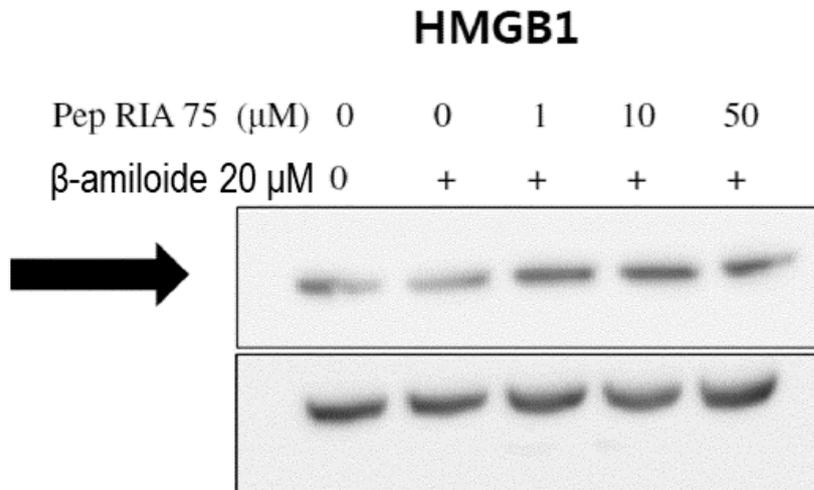


FIG. 103

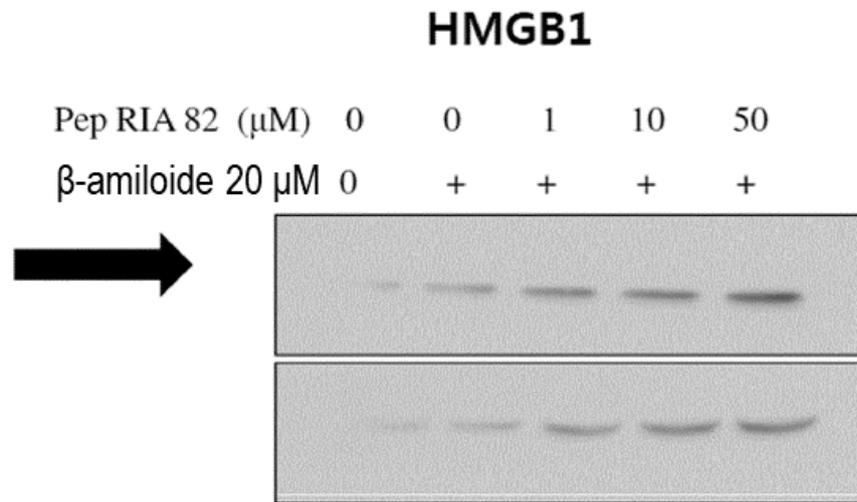


FIG. 104

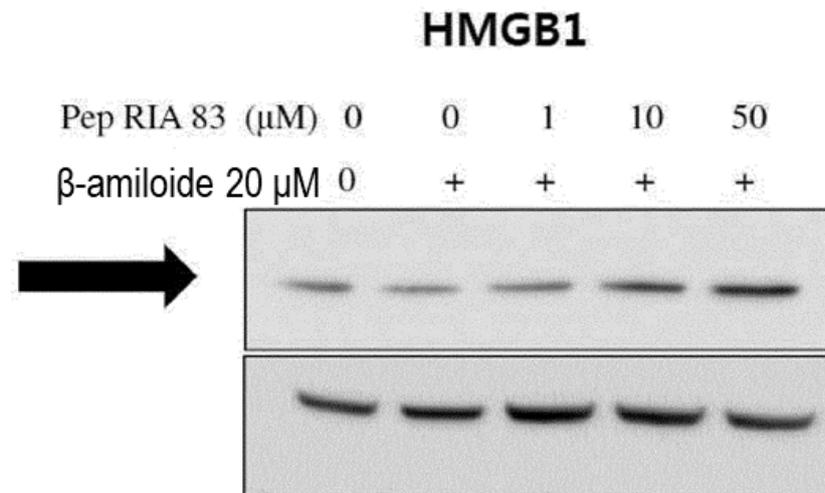


FIG. 105

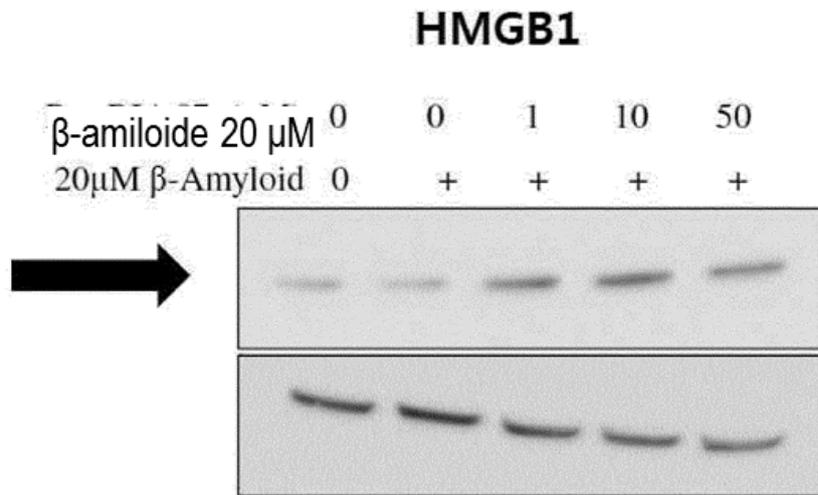


FIG. 106

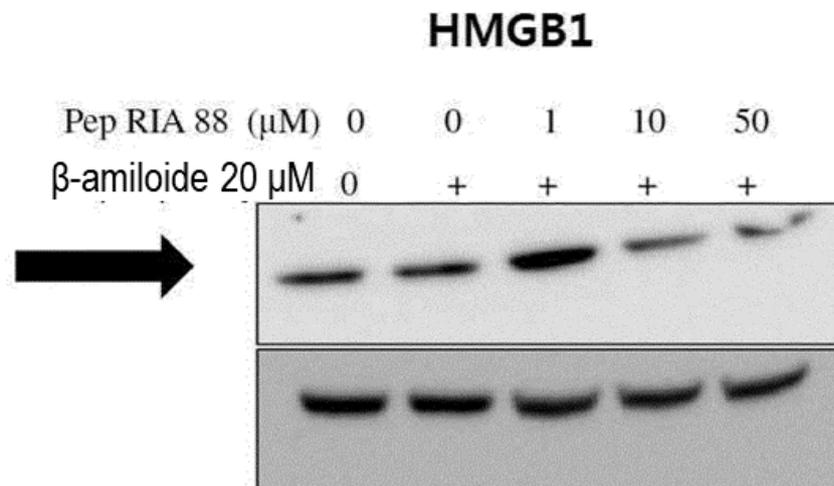


FIG. 107

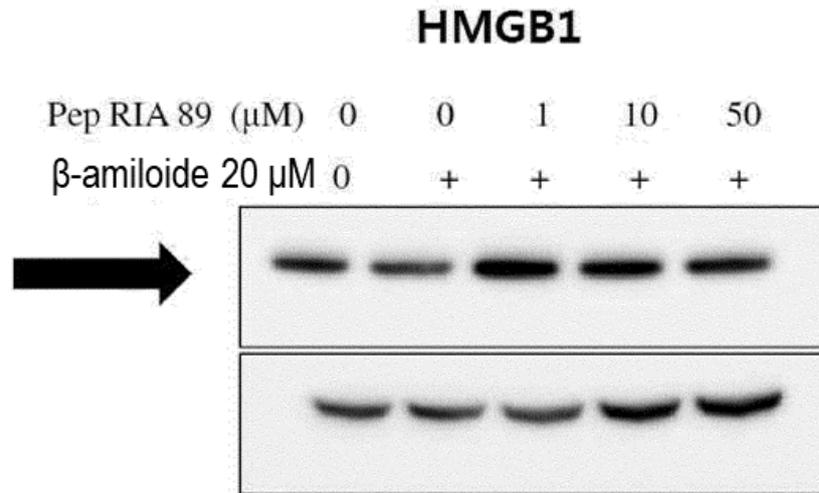


FIG. 108

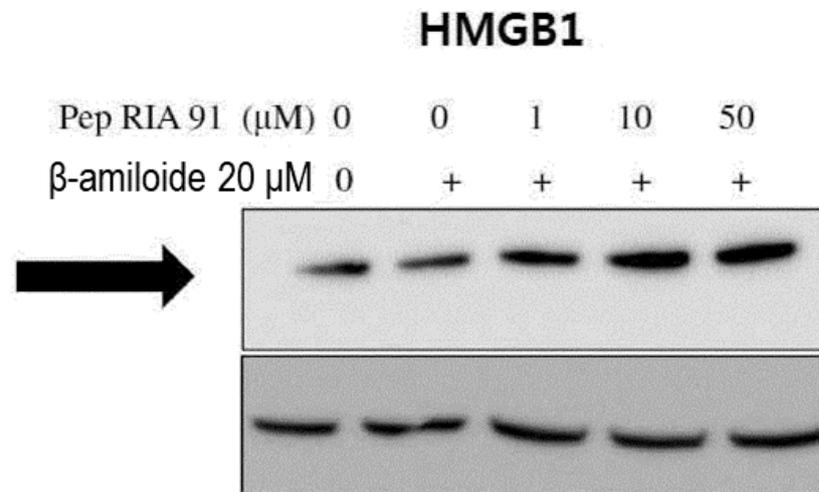


FIG. 109

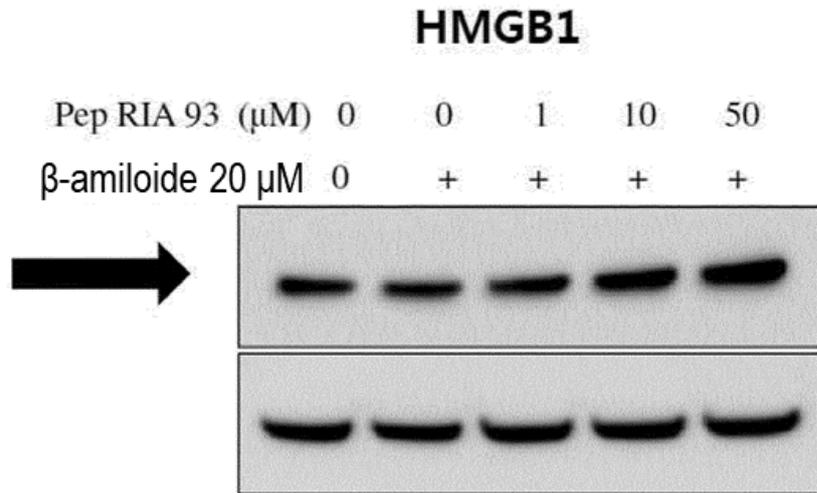


FIG. 110

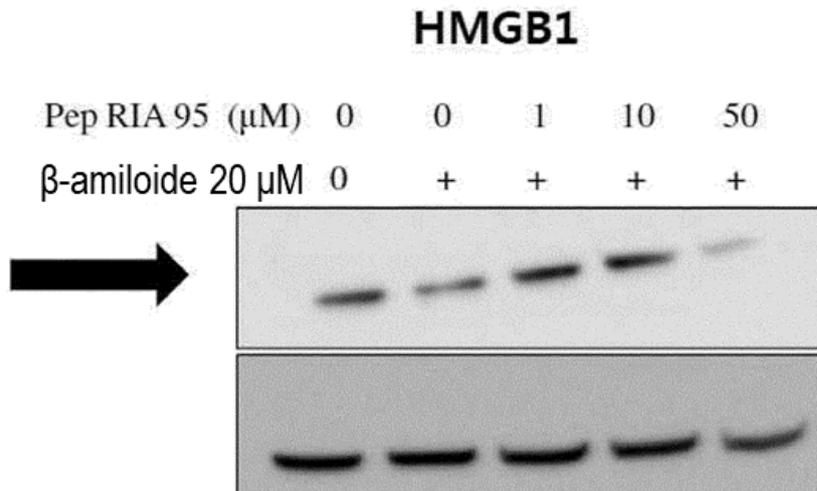


FIG. 111

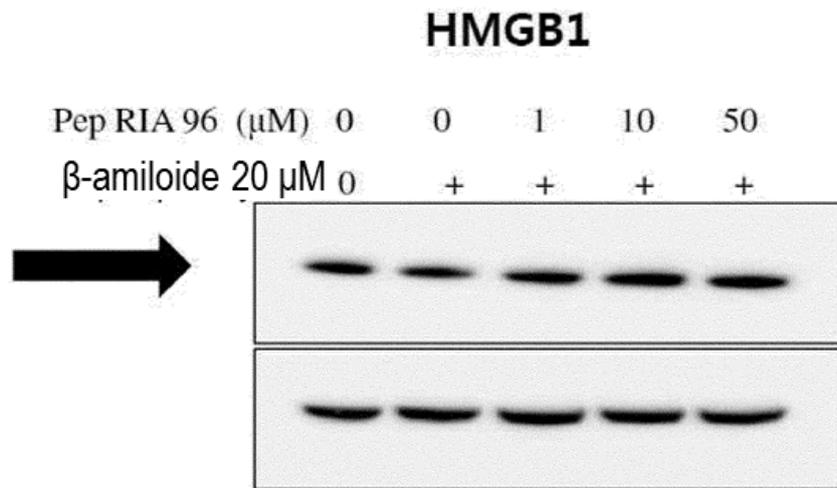


FIG. 112

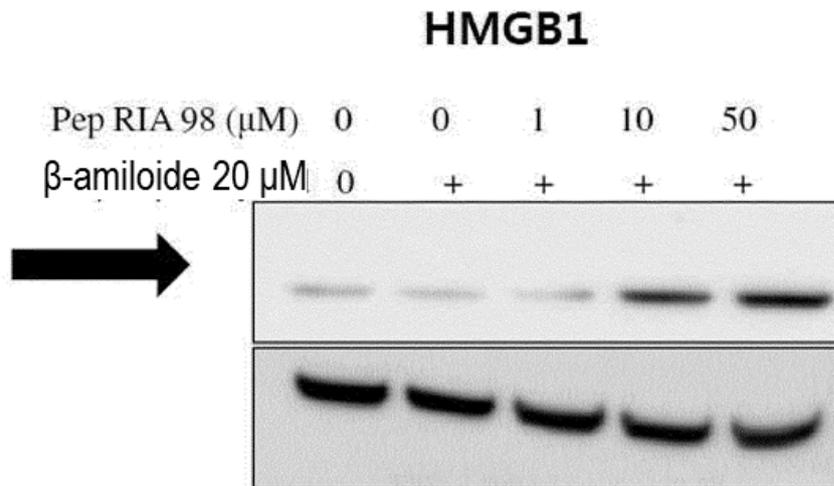


FIG. 113

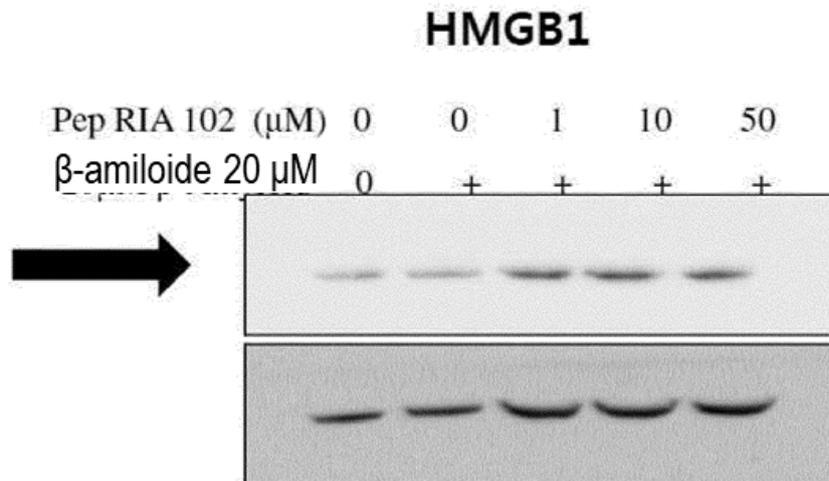


FIG. 114

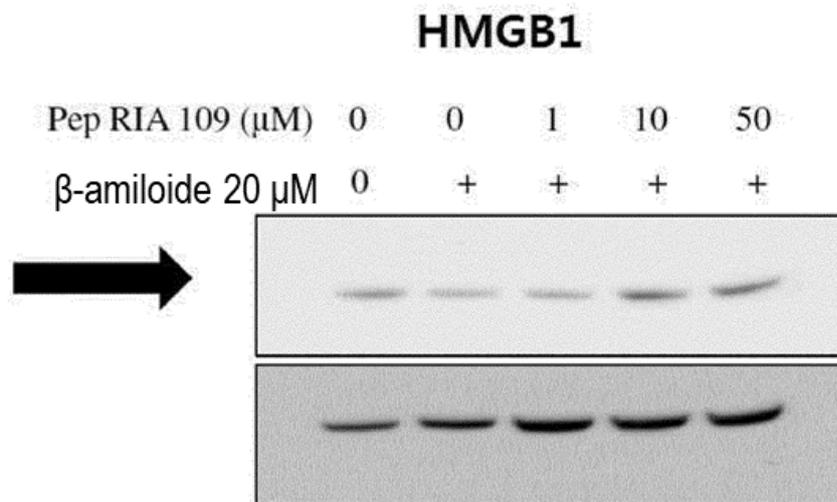


FIG. 115

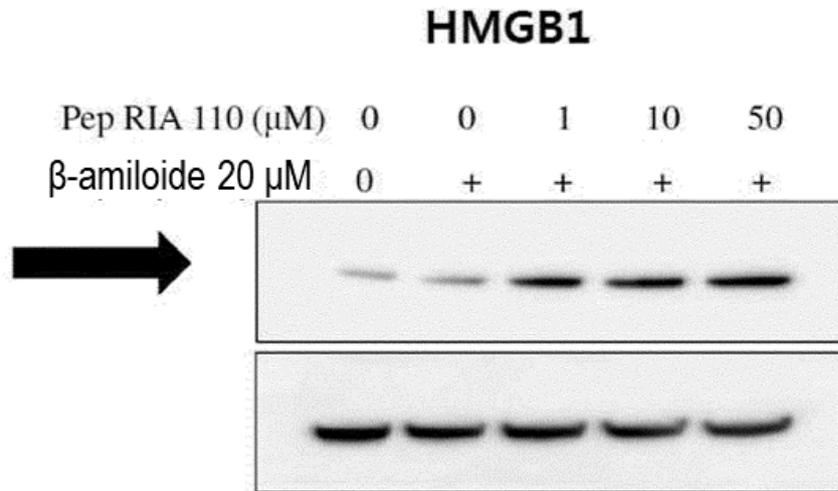


FIG. 116

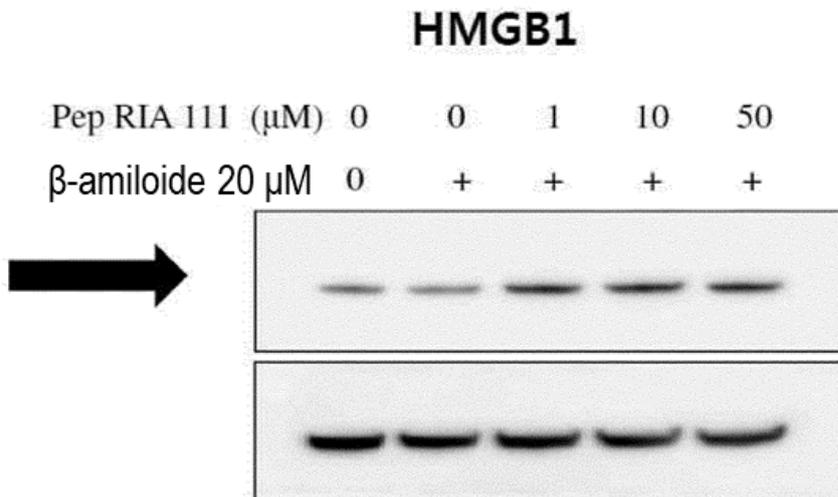


FIG. 117

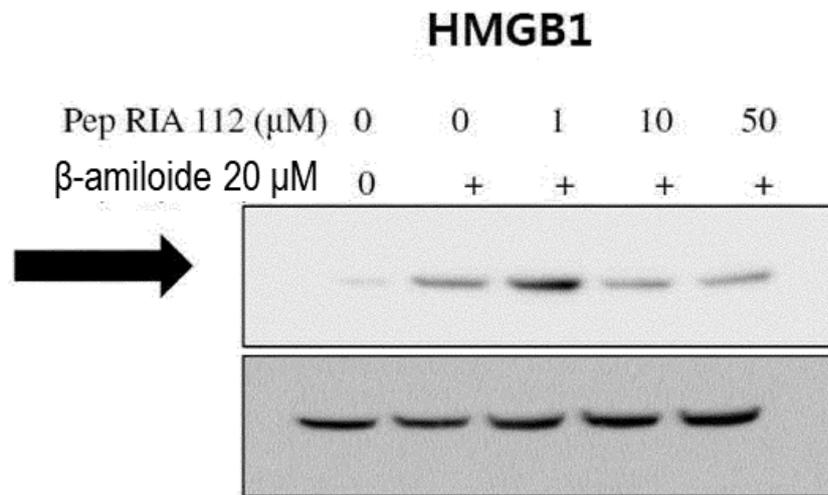


FIG. 118

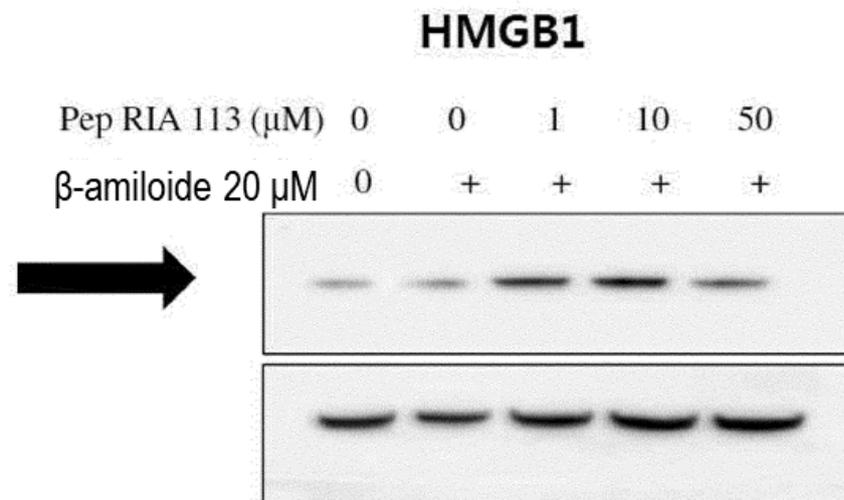


FIG. 119

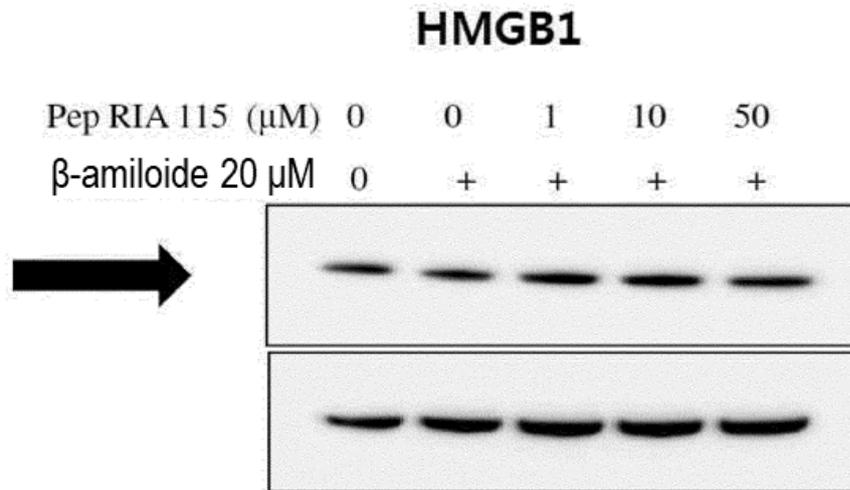


FIG. 120

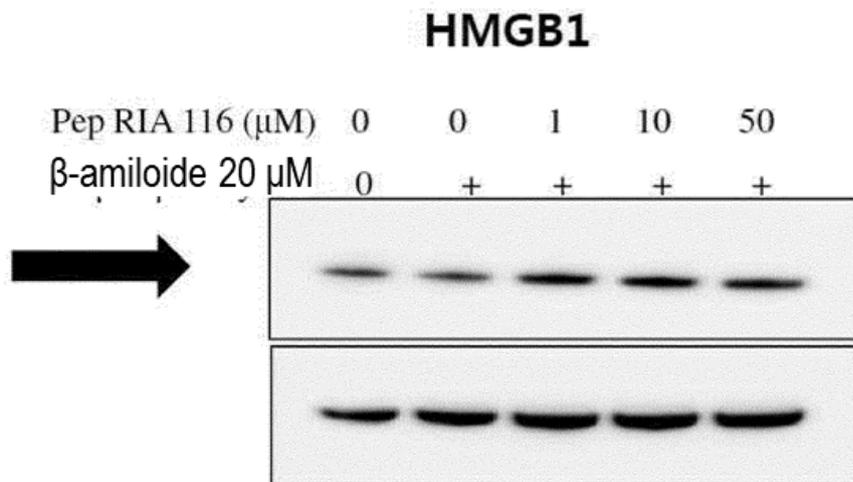


FIG. 121

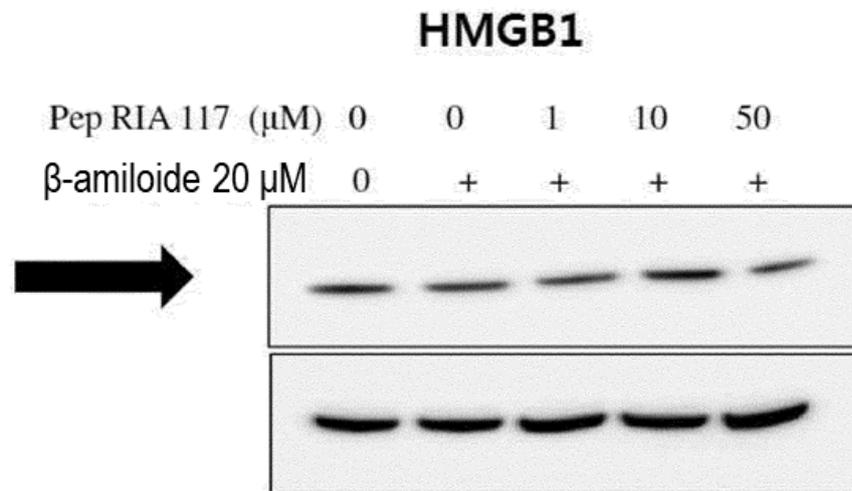


FIG. 122

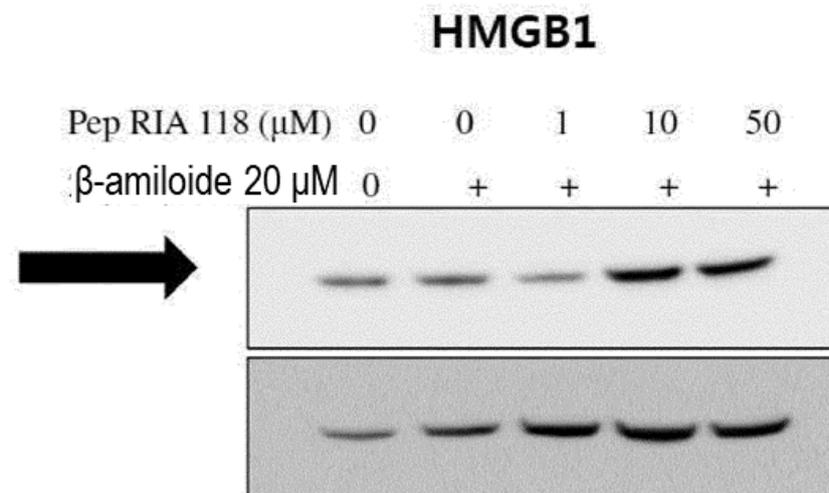


FIG. 123

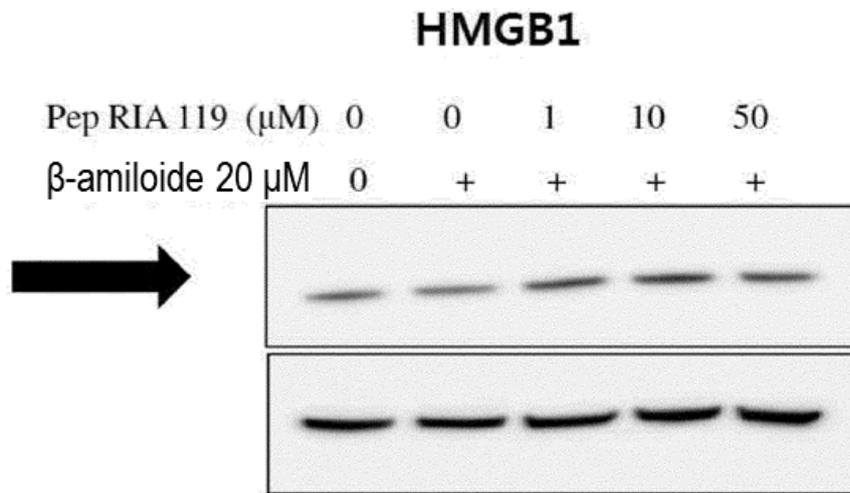


FIG. 124

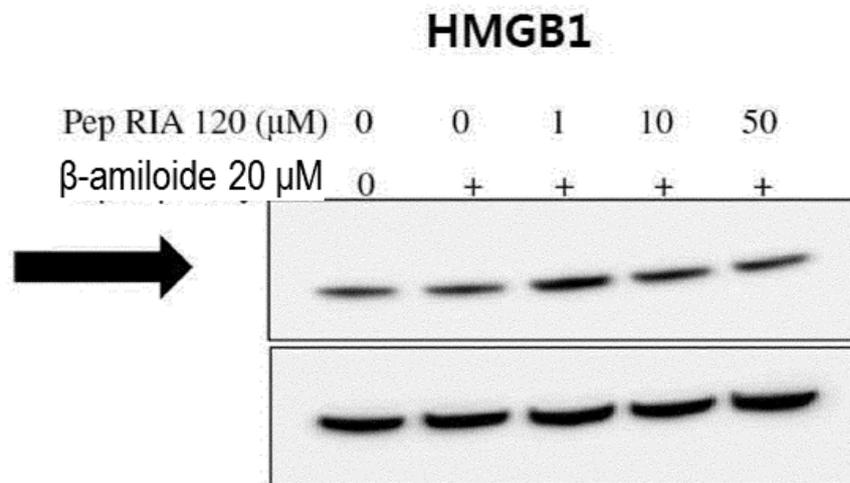


FIG. 125

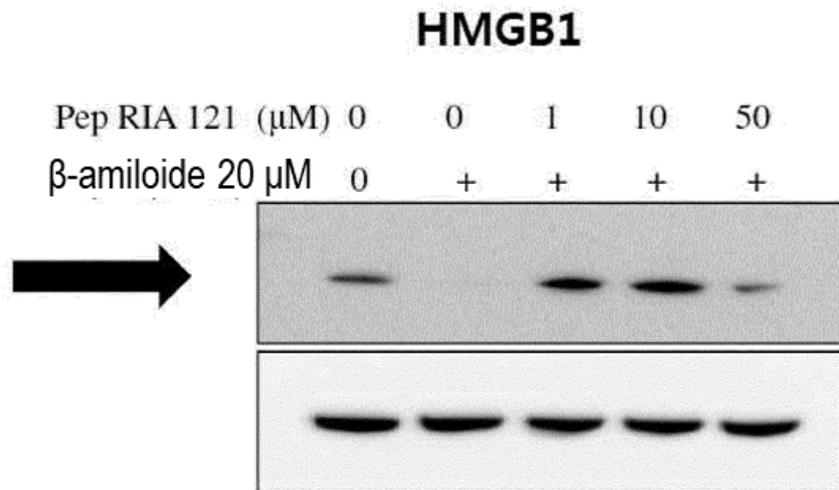


FIG. 126

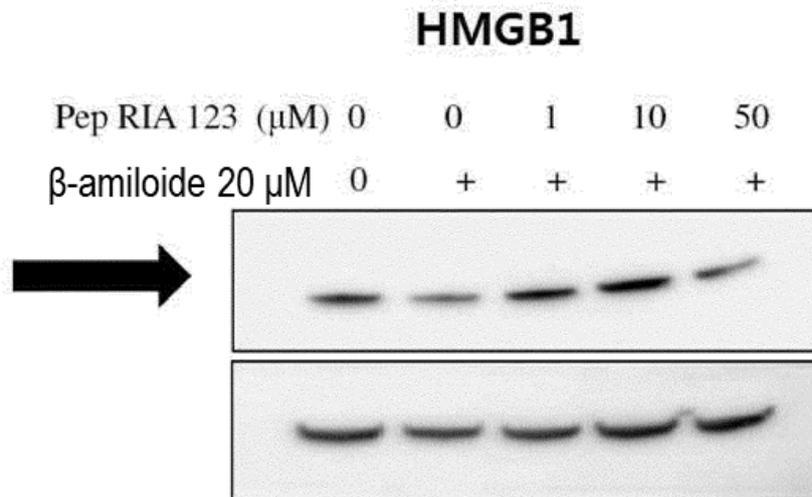


FIG. 127

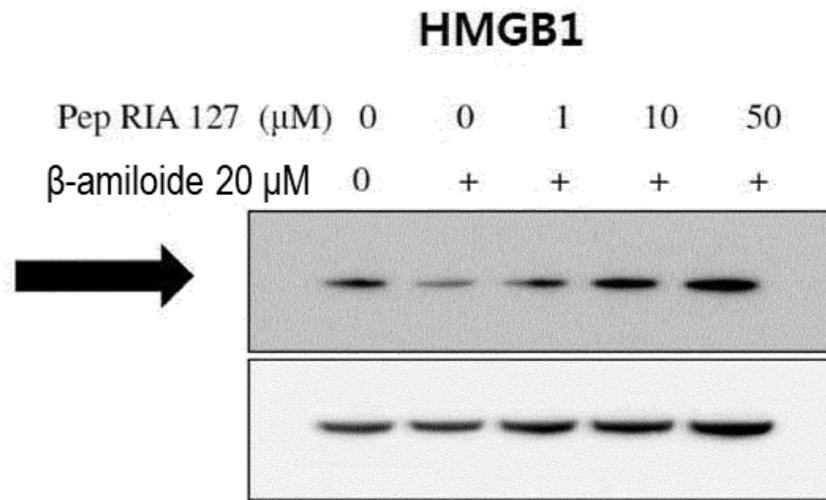


FIG. 128

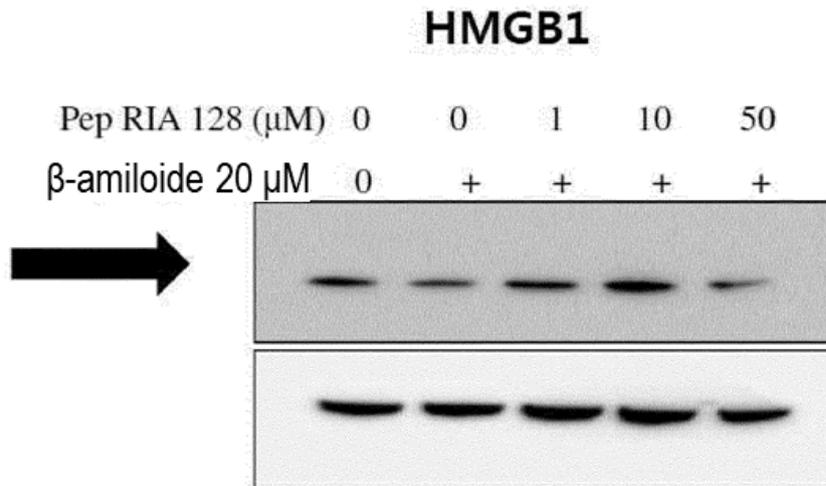


FIG. 129

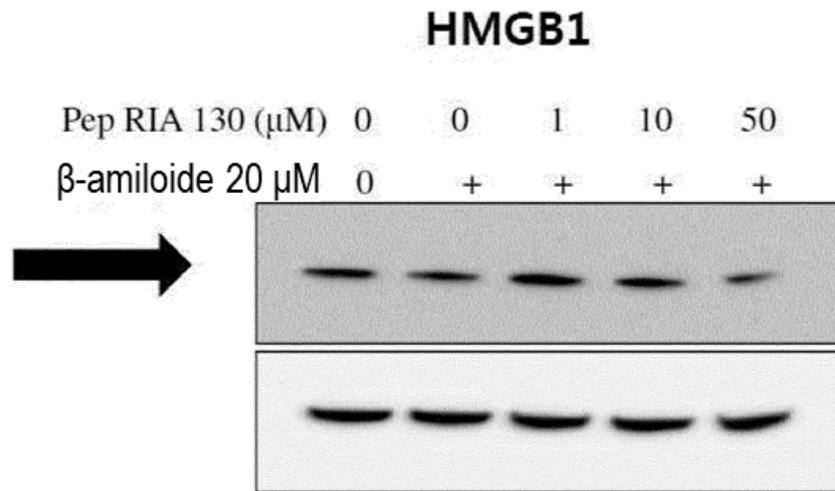


FIG. 130

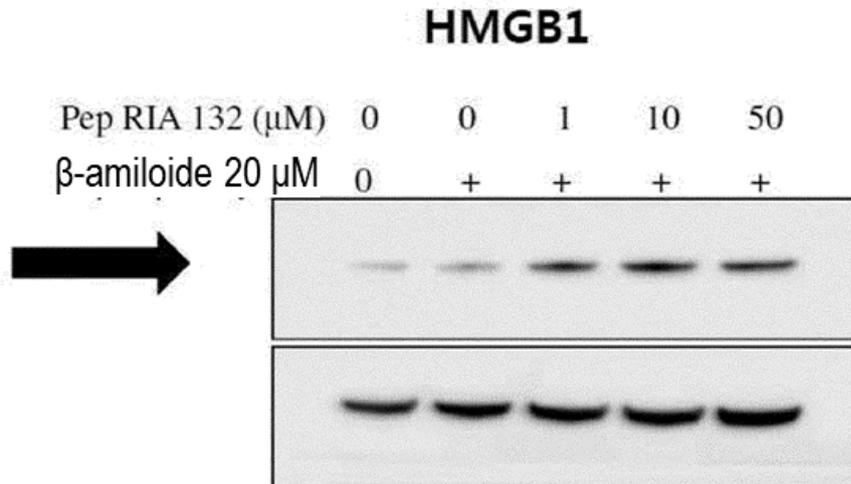


FIG. 131

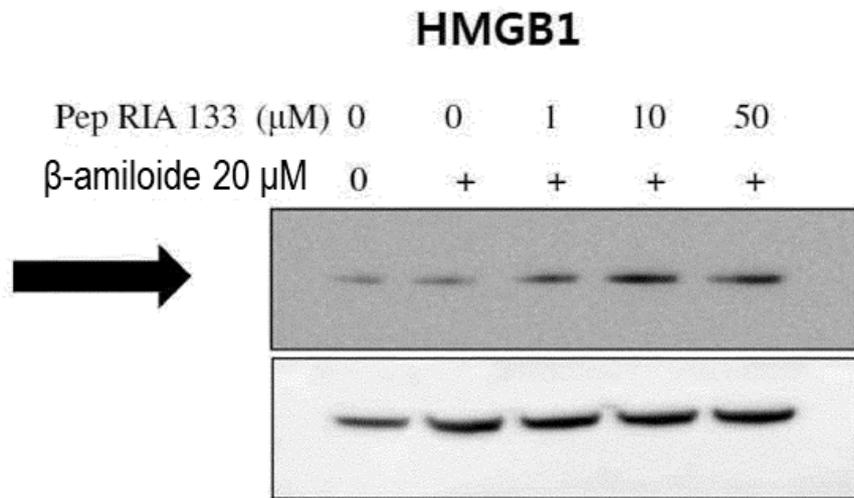


FIG. 132

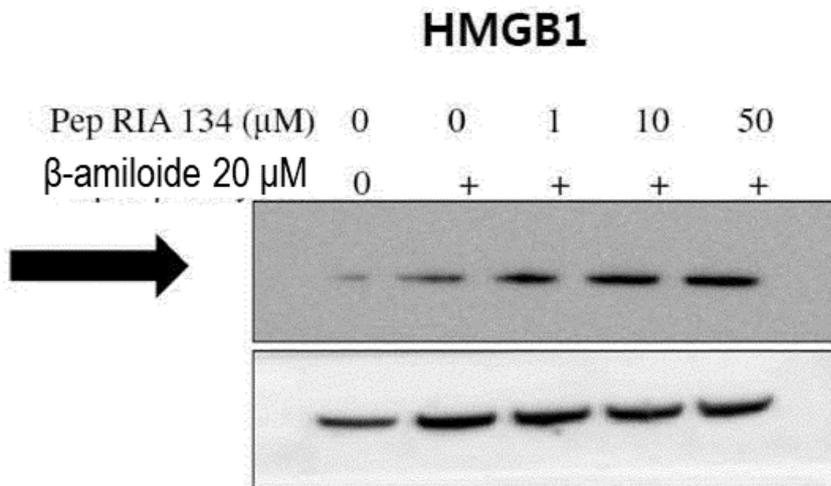


FIG. 133

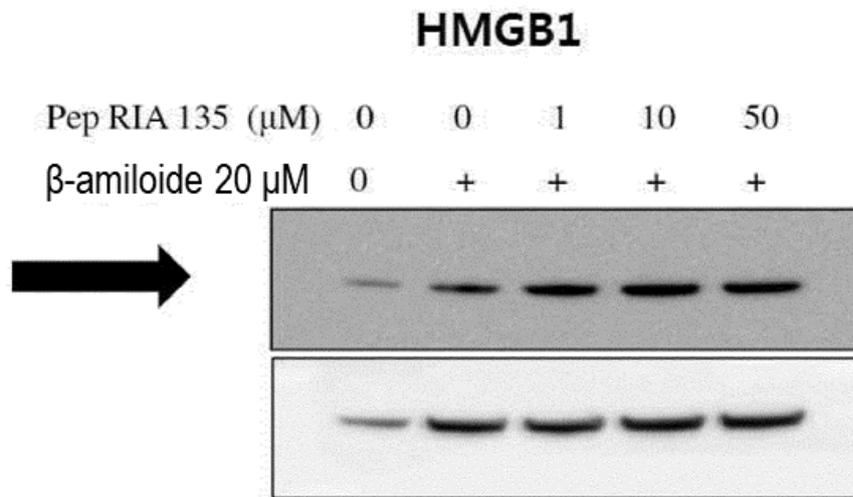


FIG. 134

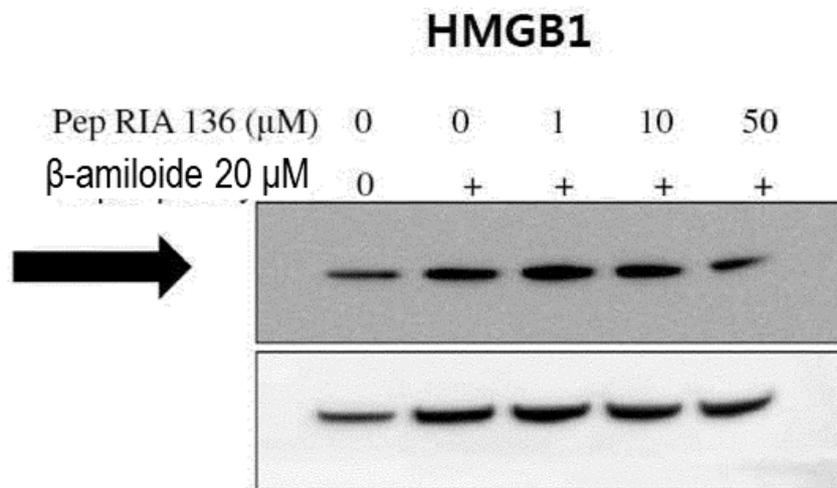


FIG. 135

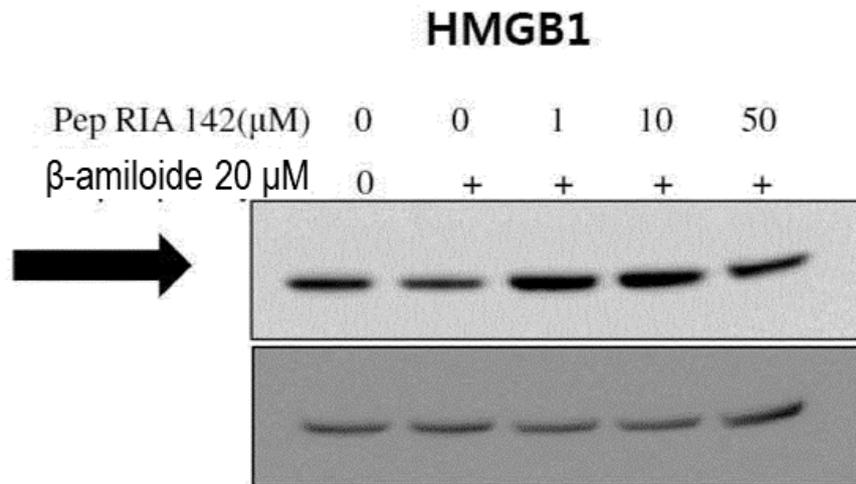


FIG. 136

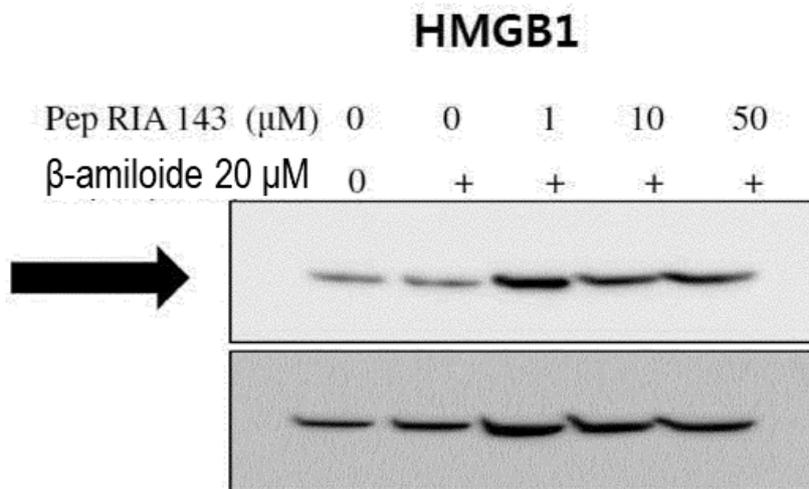


FIG. 137

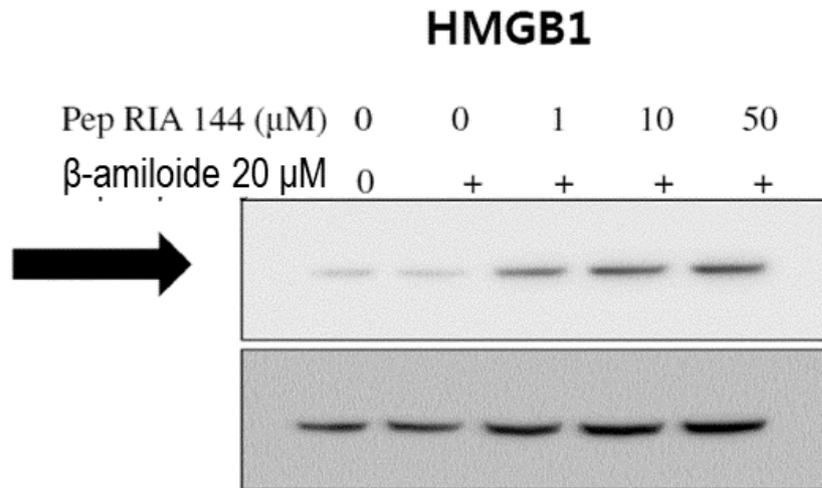


FIG. 138

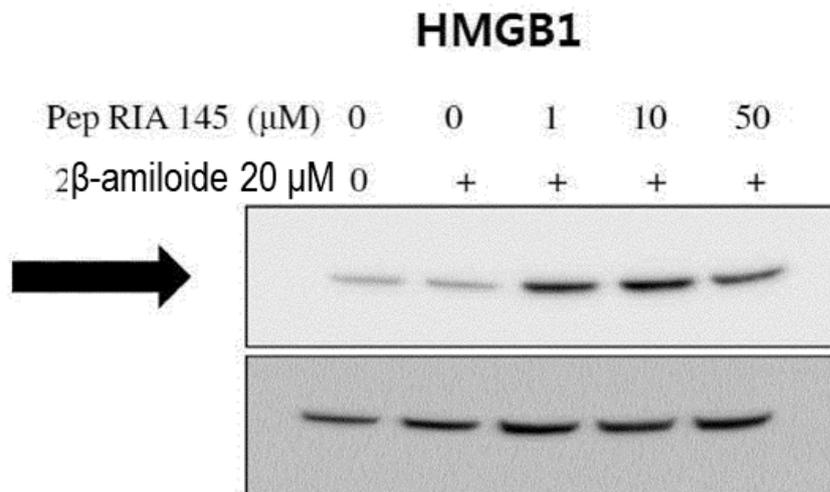


FIG. 139

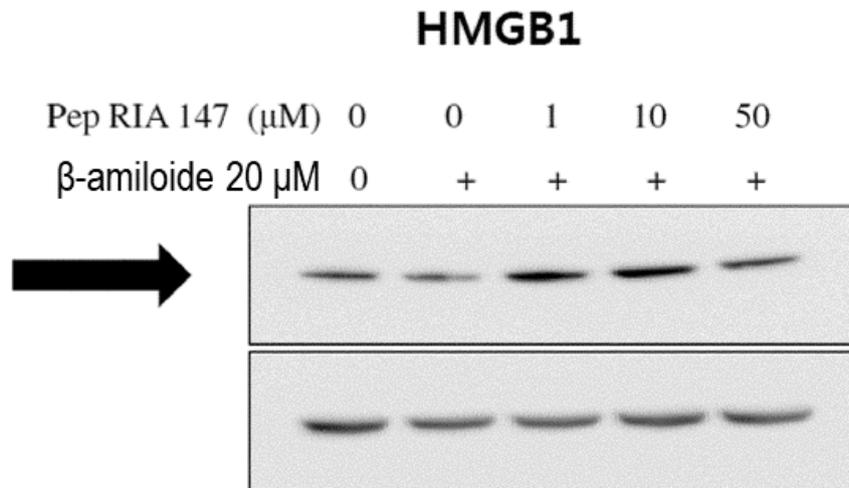


FIG. 140

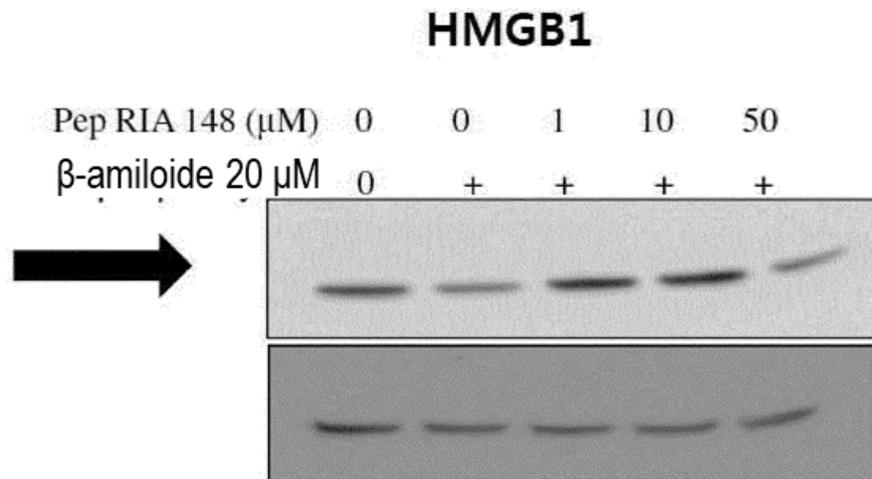


FIG. 141

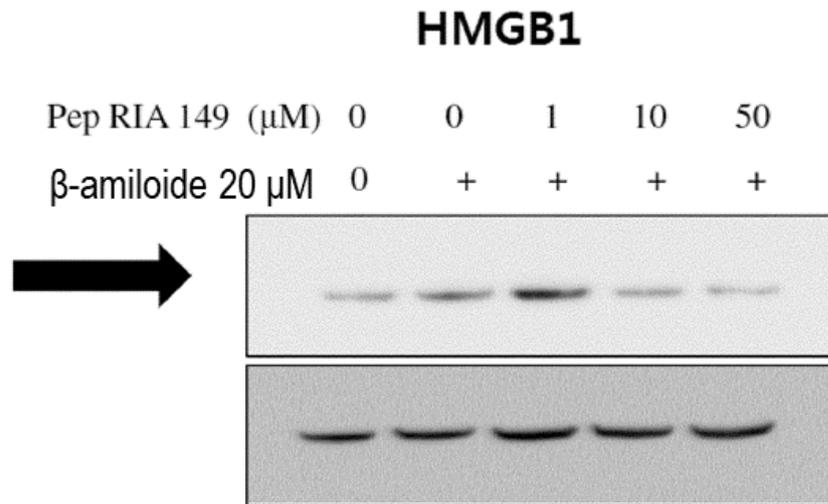


FIG. 142

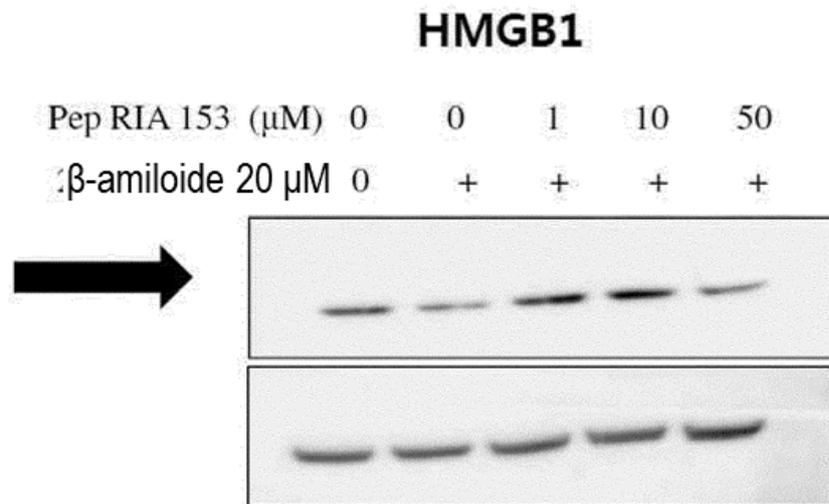


FIG. 143

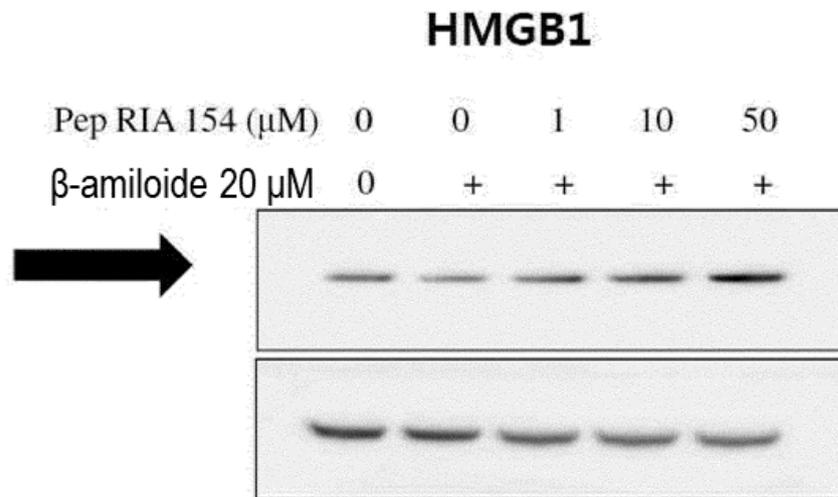


FIG. 144

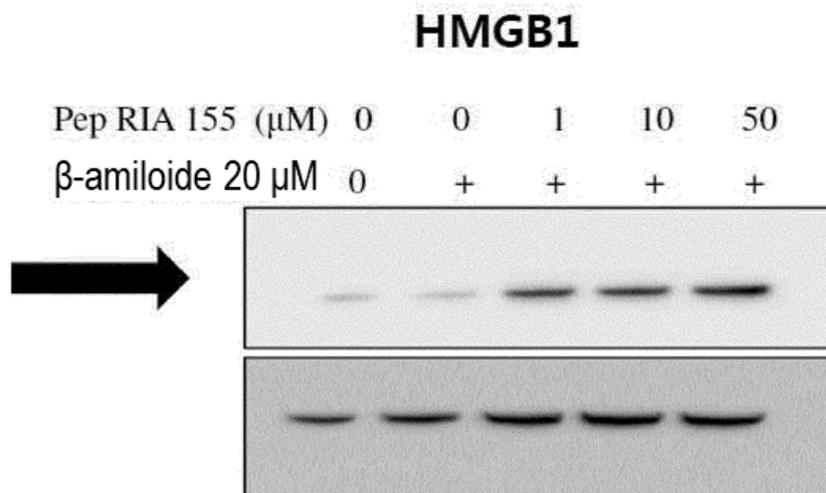


FIG. 145

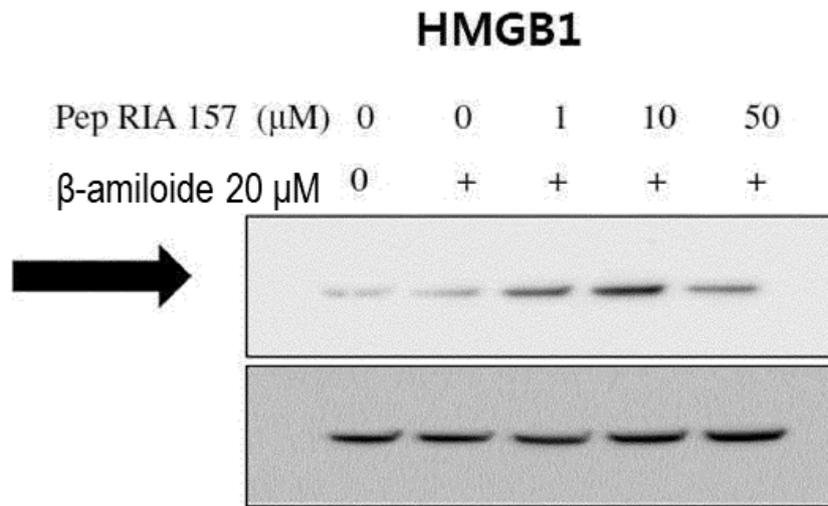


FIG. 146

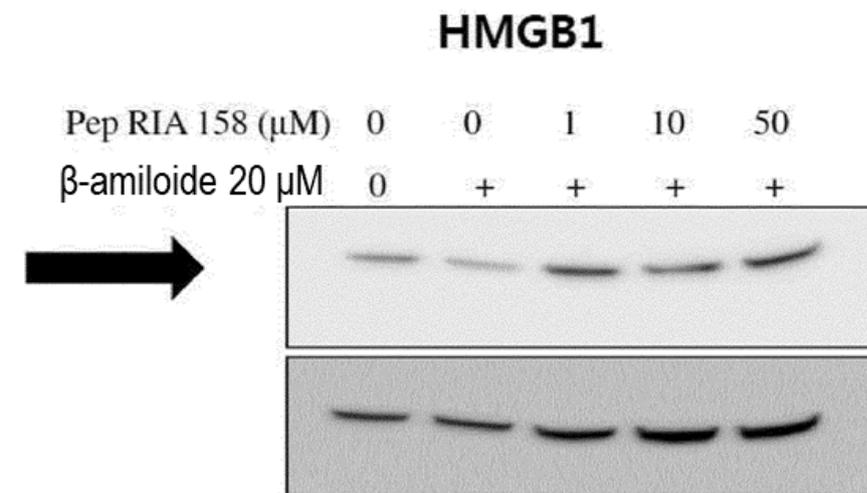


FIG. 147

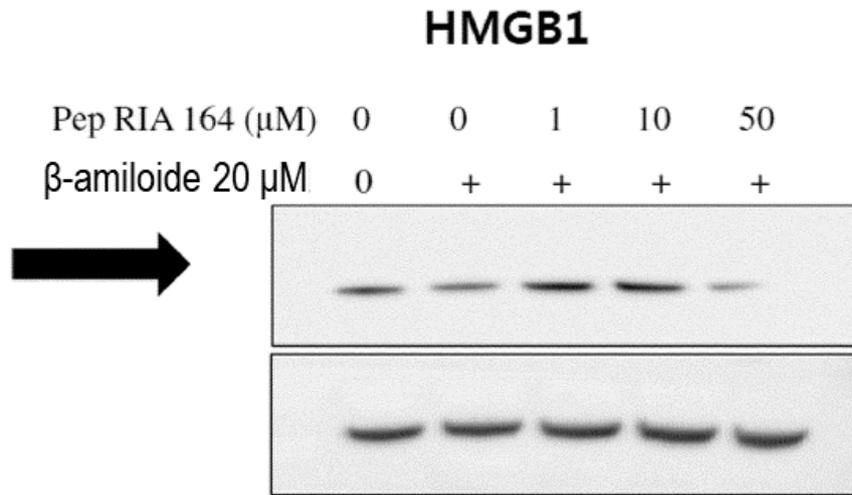


FIG. 148

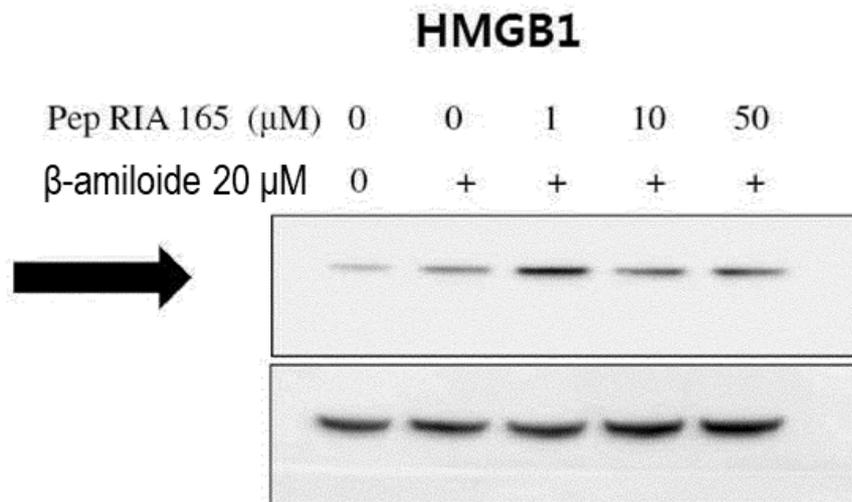


FIG. 149

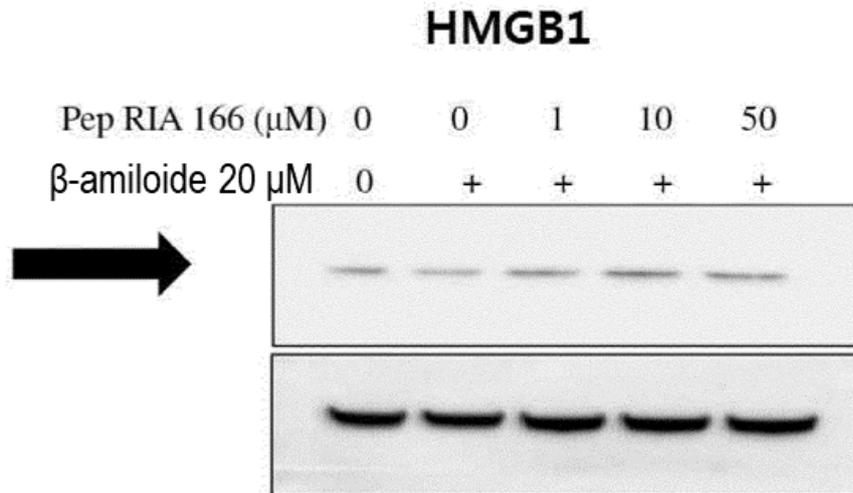


FIG. 150

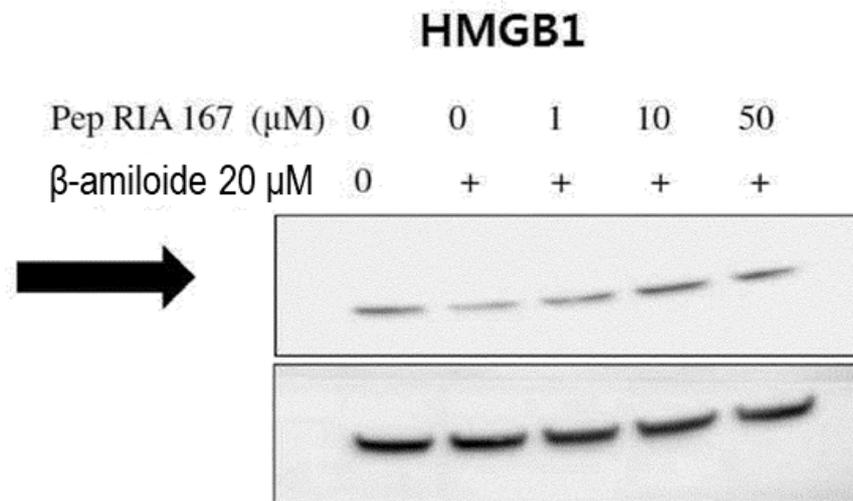


FIG. 151

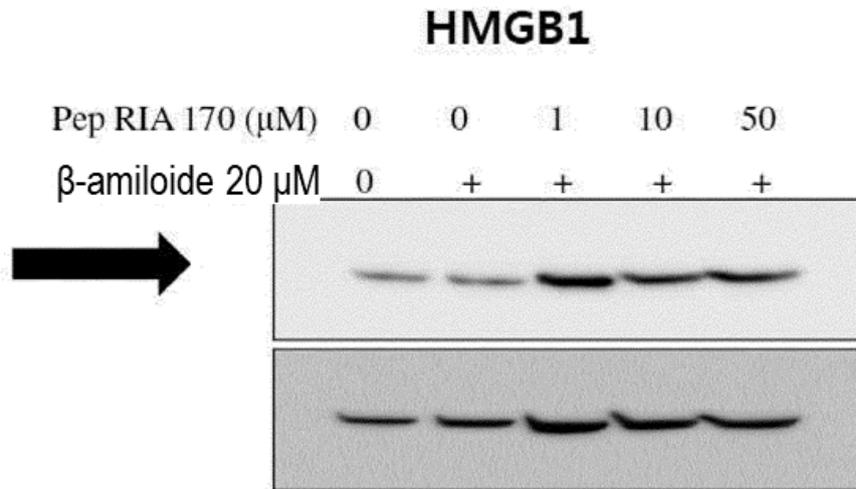


FIG. 152

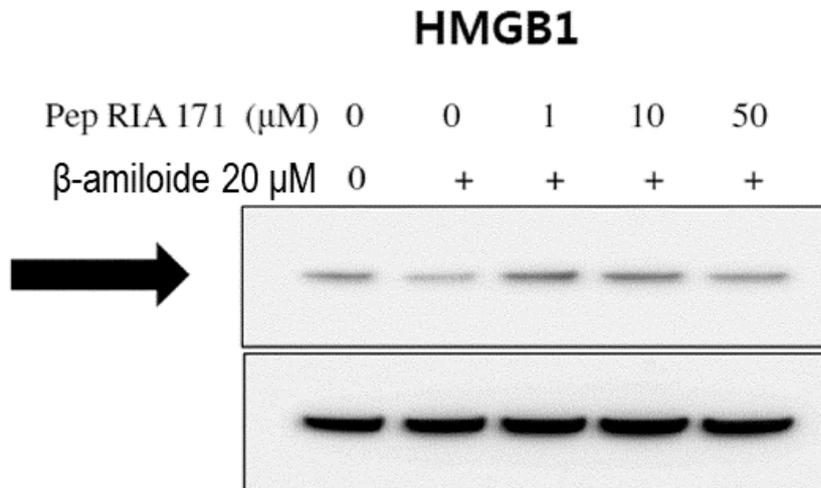


FIG. 153

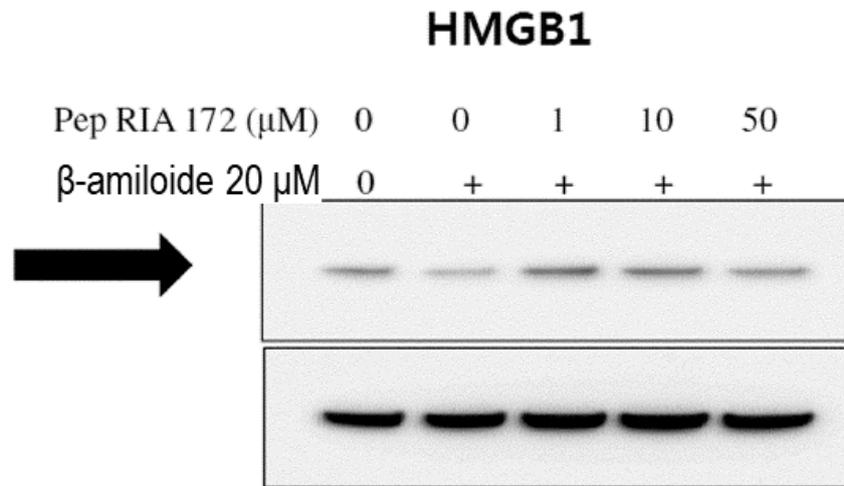


FIG. 154

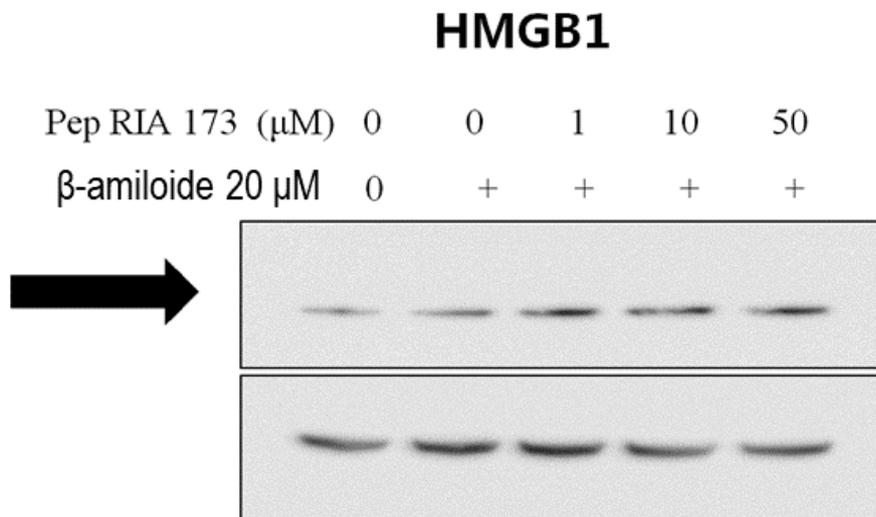


FIG. 155

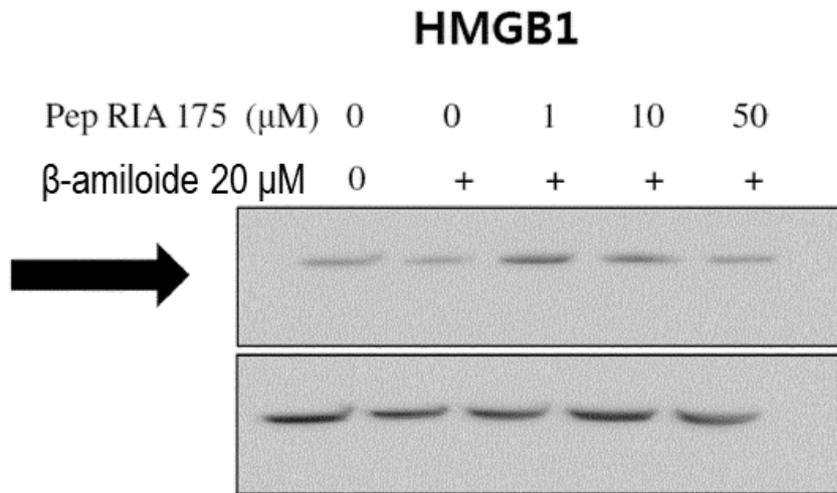


FIG. 156

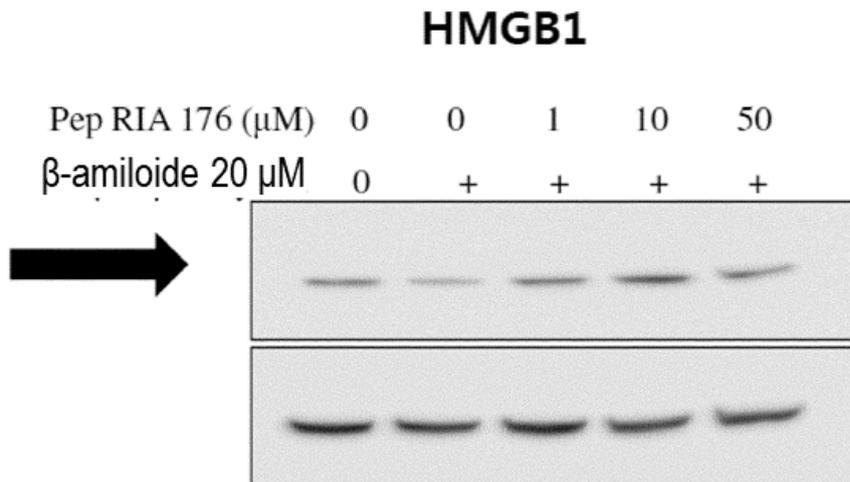


FIG. 157

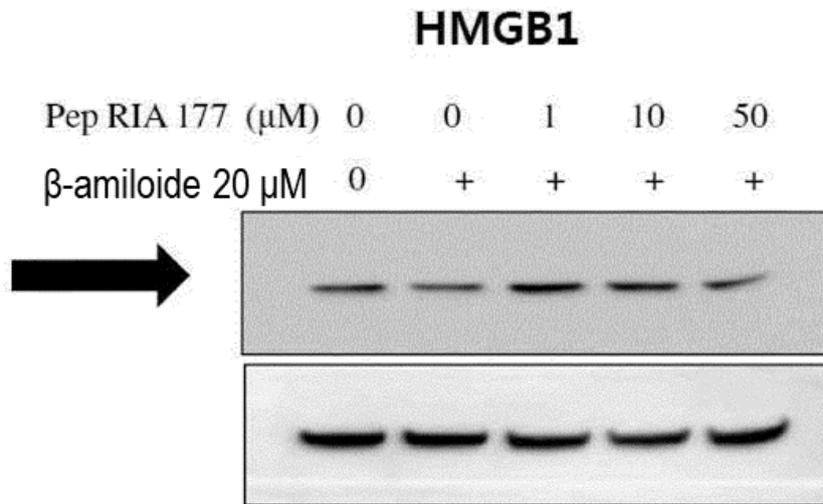


FIG. 158

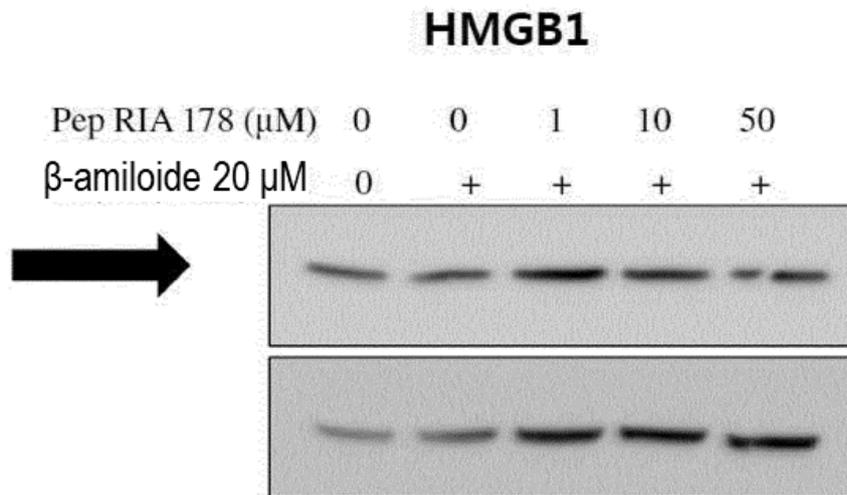


FIG. 159

