

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 740 953**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.06.2012** **PCT/US2012/040455**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.12.2012** **WO12167077**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.06.2012** **E 12729266 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019** **EP 2714064**

54 Título: **Bloqueo de proteasas inflamatorias con theta-defensinas**

30 Prioridad:

02.06.2011 US 201161492753 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.02.2020

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
CALIFORNIA (100.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US**

72 Inventor/es:

**SELSTED, MICHAEL E. y
TRAN, DAT Q.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 740 953 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

Bloqueo de proteasas inflamatorias con theta-defensinas

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al uso de péptidos cíclicos para modular la actividad de las citocinas, incluyendo las vías de señalización e inflamatorias, en diversas enfermedades. Más en particular, los péptidos cíclicos poseen actividades biológicas desconocidas, tales como la inhibición de las sheddasas y otras proteasas pertinentes (metaloproteinasas y cisteína proteasas), con aplicación en enfermedades en las que las actividades de estas proteasas se relacionan con la patogenia de la enfermedad.

Antecedentes

- 10 La siguiente descripción incluye información que puede ser útil para comprender la materia objeto inventiva. No se admite que ninguna información proporcionada en el presente documento sea técnica anterior o pertinente a las invenciones que se reivindican en el presente documento ni que ninguna publicación referenciada específica o implícitamente sea técnica anterior.

- 15 Los péptidos cíclicos que se describen en el presente documento son agentes terapéuticos recientemente descubiertos que tienen como diana vías enzimáticas proinflamatorias de importancia clínica conocida, tales como la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) ("TACE", también conocida como ADAM17) y otras metaloenzimas (por ejemplo, sheddasas y metaloproteinasas de matriz ("MMP") que están implicadas en la inflamación patológica, la degradación de los tejidos y la movilización de factores de crecimiento que promueven la proliferación de células cancerosas.

- 20 Las metaloproteinasas regulan muchos procedimientos biológicos, que van desde la programación del desarrollo, la respuesta a la lesión o infección tisular, la remodelación de cicatrices y la estimulación de la división celular. La regulación de la actividad metaloproteinasas es crucial para la homeostasis celular y tisular. Un número de patologías se asocian a la sobreexpresión de actividades de metaloenzimas. Por ejemplo, las articulaciones afectadas por la artritis reumatoide y otras formas de artritis tienen niveles elevados de MMP y TNF- α , que se libera de la superficie celular de células que expresan pro-TNF- α por TACE. El bloqueo del TNF- α con anticuerpos monoclonales ha demostrado ser eficaz en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR) en una fracción significativa de pacientes con AR que no responden a fármacos de primera línea, tales como dosis bajas de metotrexato. Debido a que el bloqueo del TNF- α para la AR no es eficaz en todos los casos y debido a que existen efectos secundarios graves asociados a los bloqueantes de TNF- α en un subconjunto de pacientes, se hacen esfuerzos continuos para desarrollar estrategias antiinflamatorias. En este sentido, numerosas compañías farmacéuticas han centrado los programas de desarrollo de fármacos en el descubrimiento de inhibidores de TACE, pero ninguno ha sido aprobado por la FDA.

- 35 Las theta defensinas (θ -defensinas) son péptidos cíclicos naturales que se expresan en tejidos de macacos de la India, babuinos y otros monos del Viejo Mundo. No se expresan en humanos u otros homínidos. Las θ -defensinas de origen natural están compuestas por un anillo de 18 aminoácidos estabilizadas por tres enlaces disulfuro que se conservan en todas las θ -defensinas conocidas. Al igual que otras defensinas, las θ -defensinas se descubrieron originariamente basándose en las propiedades antimicrobianas de los péptidos. Sin embargo, los inventores han descubierto una segunda propiedad, una propiedad desconocida hasta ahora de las θ -defensinas, como factores antiinflamatorios potentes. Como se describe adicionalmente en el presente documento, las estructuras naturales y modificadas de las θ -defensinas son capaces de regular la inflamación tanto *ex vivo* como *in vivo*. Lo que es más importante, se descubrió que las θ -defensinas y péptidos derivados de la estructura de las θ -defensinas (por ejemplo, péptidos cíclicos), son capaces de inhibir TACE, un factor clave en la inflamación por TNF- α . Este descubrimiento totalmente nuevo de que las θ -defensinas son inhibidores naturales de TACE ahora proporciona una fuente vital para moléculas capaces de regular la inflamación a través de vías endógenas relacionadas con citocinas existentes en un sujeto. Estos péptidos son el único producto natural conocido expresado en animales que es un regulador soluble de TACE. Por tanto, pueden usarse péptidos cíclicos como agentes terapéuticos en una diversidad de patologías o afecciones, tales como enfermedades autoinmunitarias y otras enfermedades inflamatorias, que son resultado de una actividad disfuncional de las citocinas, y una diversidad de enfermedades y/o afecciones inflamatorias en seres humanos puede deberse a pérdida de expresión de θ -defensinas durante la evolución de los primates.

- 50 Adicionalmente, factores tales como TACE son miembros de una clase más amplia de moléculas conocidas como sheddasas, que poseen una actividad biológica de escisión de dominios de proteínas extracelulares. Esta actividad de escisión ha proporcionado una vía terapéutica para potenciar la eficacia de determinados tratamientos, tales como trastuzumab (Herceptin) mediante la inhibición de la sheddasa ADAM10, para su uso en cáncer de mama. Normalmente, la escisión por sheddasa ADAM10 de Her2 conduce a un fragmento Her2 que posee actividad cinasa constitutiva con señales de crecimiento y supervivencia independientes de ligando para células en proliferación. Sin embargo, los efectos nocivos de este proceso pueden verse obstaculizados a través de la inhibición de sheddasas. Por tanto, los péptidos cíclicos que poseen actividad inhibidora de sheddasas proporcionan enfoques terapéuticos para una diversidad aún más amplia de enfermedades y/o afecciones, incluyendo aquellas en las que los cambios

en la estructura, expresión y/o función de metaloproteinasas se relacionan con la patogenia de la enfermedad y/o afección.

Durante más de una docena de años, las compañías farmacéuticas han buscado desarrollar inhibidores de TACE. Si bien se demostró que varias moléculas pequeñas (principalmente hidroxamatos) son eficaces en modelos animales de AR, ninguno de estos compuestos se ha aprobado debido a toxicidades inaceptables en seres humanos. De hecho, todos los antagonistas del TNF existentes tienen advertencias de recuadro negro, la advertencia más grave de la Administración de Alimentos y Fármacos de los Estados Unidos (FDA) que un medicamento puede llevar sin retirarlo del mercado en los Estados Unidos. El documento WO03105883 A1 se refiere al uso de theta defensin-1 de macaco para la producción de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de pacientes con infecciones graves (bacteriemia), incluyendo el choque séptico. El documento US 2008/255052 A1 se refiere a un procedimiento de inhibición de infecciones microbianas, incluyendo el choque séptico, que limita la patología inmunomediada y mejora la función inmunitaria en un individuo mediante la administración de una theta defensina. En "*Implication of TNF- α convertase (TACE/ADAM17) in inducible nitric oxide synthase expression and inflammation in an experimental model of colitis*", (2001), *CYTOKINE* vol. 16, n.º 6, páginas 220-226, Colón A.L. y col. se refieren al papel de TACE en la inflamación y la colitis en modelos experimentales en ratas y la relación entre TACE y la óxido nítrico sintasa inducible.

Por tanto, la aparición de un inhibidor de TACE no tóxico que sea eficaz en una enfermedad tal como la AR sería una adición valiosa a los enfoques terapéuticos para la AR, enfermedades autoinmunitarias e inflamatorias relacionadas, así como otras enfermedades que impliquen actividad metaloproteinasa, tales como el cáncer. En términos más generales, todavía existe la necesidad de medicamentos para tratar afecciones inflamatorias y relacionadas con la inflamación, especialmente afecciones inflamatorias crónicas, así como procedimientos de fabricación, comercialización y administración de dichos medicamentos.

Sumario de la invención

En un aspecto, la presente invención reivindica una θ -defensina, o un análogo de la misma, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria crónica en un animal, como se establece en las reivindicaciones. El aparato, los sistemas y los procedimientos en los que una composición farmacológica que incluye una θ -defensina, un análogo o un derivado de la misma se investiga y comercializa para tratar una afección inflamatoria, se desvelan en el presente documento.

A la fecha de esta presentación, las composiciones farmacológicas preferidas incluyen al menos uno de entre RTD-1-27, RTD-1-28 y RTD1-29.

El aspecto de investigación que se desvela en el presente documento incluye estudios de toxicidad, eficacia y dosis-respuesta. Cualquiera de estos estudios puede ser realizado directamente por una compañía farmacéutica u otra en sus propios laboratorios o indirectamente a través de una compañía subsidiaria o incluso no relacionada, todo lo cual debe entenderse en el presente documento como que se desvela en el concepto de determinación de la eficacia de la composición farmacológica.

El efecto o efectos antiinflamatorios contemplados en el presente documento deben interpretarse que incluyen ampliamente toda la inhibición pertinente clínicamente de compuestos relacionados con la inflamación, incluyendo, por ejemplo, la inhibición de la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (TACE), Catepsina C u otras proteasas proinflamatorias, la familia ADAM de metaloproteasas y otras sheddasas.

La etapa que se desvela de proporcionar la composición farmacológica al mercado debe interpretarse en el presente documento como la fabricación, o haber fabricado, o la supervisión, el control o la dirección de cualquier otra manera de la fabricación de una cantidad comercial de la composición farmacológica. Las cantidades comerciales mínimas contempladas incluyen un total de 1 kilogramo, 10 kilogramos, 100 kilogramos y 1000 kilogramos, durante cualquier período dado de un año en una o más instalaciones de producción.

Un aspecto interesante de la θ -defensina, análogo o derivados de misma contemplados es que muchos de estos compuestos son altamente estables frente a ácidos y proteasas y podrían administrarse en una formulación oral.

Al menos en parte debido a que las composiciones terapéuticas contempladas pueden afectar a la TACE y/o a sheddasas, se contempla que pueden tratarse muchas afecciones inflamatorias diferentes, incluyendo, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal y otras enfermedades inflamatorias crónicas que comprenden enfermedades autoinmunitarias. Se desvela en el presente documento que los procedimientos y composiciones contemplados en el presente documento podrían comercializarse ventajosamente para tratar a personas que no responden a un tratamiento anti-TNF- α .

También se desvelan medicamentos y procedimientos de fabricación de medicamentos para la administración a un ser humano o animal no humano, en los que el medicamento incluye al menos una de una θ -defensina novedosa, análogo o derivado de la misma que se desvelan en el presente documento o en una solicitud prioritaria que se comercializa para tratar una afección inflamatoria. Son de particular interés RTD-1-27, RTD-1-28 y RTD-1-29.

Diversos objetos, características, aspectos y ventajas de la materia objeto inventiva serán más evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de realizaciones preferidas

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Biosíntesis y estructura de θ -defensina. Se escinden y se cortan y empalman nonapéptidos sustituyentes (codificados por color) para producir el péptido maduro RTD-1.

Fig. 2. Alineación de prepro- θ -defensinas. **A.** Se alinean manualmente secuencias de aminoácidos de BTd-a a BTd-d predichas a partir de ADNc con RTD1a a RTD1c y pseudogén de θ -defensina humana (HTDp). Los puntos en las secuencias alineadas denotan aminoácidos idénticos a los de BTd-a, el símbolo de asterisco denota la posición del codón de terminación y el símbolo # denota un codón de terminación que termina prematuramente la traducción. **B.** Estructuras cíclicas de 10 péptidos BTd deducidos derivados de secuencias de ADNc.

Fig. 3. RTD-1 reduce la letalidad de sepsis polimicrobiana en ratón. Ratones Balb/c adultos recibieron ligadura y punción cecal (LPC) a T = 0. Los ratones recibieron una inyección única de 150 μ l de solución salina normal ($\bullet$, n = 10) 4 h después de la LPC o solución salina que contenía 5 mg/kg de RTD-1 4 h ($\blacktriangle$, n = 11) o 24 h ($\blacksquare$, n = 5) después de la cirugía de LPC.

Fig. 4. Actividades anti-TNF de las θ -defensinas. **A.** Estructuras covalentes de RTD 1-6 con codificación de colores que muestran la derivación de nonapéptidos constituyentes. **B.** Se incubó sangre entera humana (1:10) con 100 UFC/ml de *E. coli* vivo durante 4 h en presencia de θ -defensina RTD-1 0-10 μ g/ml y dos α -defensinas humanas (HNP-2 y HNP-4) y se cuantificó el TNF- α mediante ELISA. **C.** Se sometieron a ensayo RTD 1-5 para determinar el efecto sobre la liberación de TNF- α desde sangre humana completa como en el panel B; se cuantificó TNF- α mediante ELISA. No se sometió a ensayo RTD-6, presente solo en cantidades traza en PMN.

Fig. 5. θ -defensinas inhiben citocinas/quimiocinas proinflamatorias inducidas por múltiples agonistas de TLR. Se incubaron células de sangre periférica humana (5×10^5 células/ml) en RPMI 1640 + plasma humano al 5 % con 10 μ g/ml de RTD-1 solo (*sin control de agonista*) o disolvente de péptido (HOAc al 0,01 %) o simultáneamente con agonistas de TLR durante 4 h a 37 °C en CO₂ al 5 % con agitación suave. Se recogieron sobrenadantes por centrifugación y los niveles de citocinas/quimiocinas se cuantificaron mediante análisis Luminex xMAP usando un panel de citocinas/quimiocinas Milliplex. Agonistas: TLR2 - 1×10^8 *L. monocytogenes* inactivado por calor; TLR4 - LPS de *E. coli* K12 3,3 ng/ml; TLR5 - flagelina de *S. typhimurium* 30 ng/ml; TLR8 - ARNm40 0,9 μ g/ml.

Fig. 6. Las θ -defensinas son inhibidores competitivos de TACE. **A.** Se incubó TACE recombinante (rTACE) con las concentraciones indicadas de péptidos + sustrato específico de TACE (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂) y se midió la actividad enzimática fluorométricamente. **B.** Se analizaron las RTD 1-5 para determinar la inhibición de TACE como en el panel A. **C.** Análisis Lineweaver-Burke de la inhibición por RTD-1 de rTACE a concentraciones de péptido de 0, 50, 100 y 150 ng/ml. **D.** Comparación de RTD-1 y estructuras análogas acíclicas "nativas" (S-7). **E.** Inhibición relativa de rTACE por RTD-1 y análogo RTD-1-S7. **F.** Inhibición de TACE por RTD-1 en células THP-1 en reposo o cebadas con LPS (2 h).

Fig. 7. Las θ -defensinas son inhibidores potentes de ADAM10. Se incubaron ADAM10 recombinante y sustrato (Mca-PLAQAV-Dpa-RSSSR-NH₂; 0,05 μ g/ml con RTD 1-3 durante 60 min a 37 °C y se midió la actividad enzimática fluorométricamente.

Fig. 8. Eficacia *in vivo* y actividades anti-TNF α y de bloqueo de TACE de mini- θ -defensinas. **A.** Estructuras covalentes de mini- θ -defensinas. **B.** Eficacia de mini- θ -defensinas en sepsis por LPC. Se realizó una cirugía de LPC en ratones BALB/c a T = 0. Cuatro h después de la cirugía, los ratones se trataron con PBS i.v. (control simulado) o 5 mg/kg de la mini- θ -defensina indicada en PBS. La eficacia del tratamiento se controló como supervivencia hasta 15 días. **C.** Se evaluaron las mini- θ -defensinas para determinar los efectos sobre la liberación de TNF α de sangre entera humana. Se diluyó sangre entera anticoagulada con EDTA 1:10 en RPMI 1640 y se incubó con células de *E. coli* vivas durante 4 h con 0-10 μ g/ml de RTD-1 (θ -defensina natural) o tres mini- θ -defensinas indicadas. **D.** El efecto de RTD-1 y tres mini- θ -defensinas sobre la actividad de TACE se determinó como se describe en la Fig. 5.

Fig. 9. Efecto de RTD-1 en artritis inducida por pristano (AIP). Se indujo AIP en ratas DA como se describe en el texto y se aleatorizaron para recibir inyecciones i.v. diarias de solución salina (N = 10) o 5 mg/kg de RTD-1 (N = 11). Se evaluó y puntuó la patología macroscópica. Cada símbolo representa la puntuación de patología macroscópica de un animal individual. En todos los casos, el tratamiento con RTD-1 indujo la resolución de la enfermedad articular que se acompañó de la recuperación de la deambulación normal.

Descripción detallada

A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido habitualmente por un experto en la materia a la que pertenece la materia objeto de la invención. Singleton y col., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 3rd ed.*, J. Wiley & Sons (Nueva

York, NY 2001); Marzo, *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure 5th ed.*, J. Wiley & Sons (Nueva York, NY 2001); y Sambrook y Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd ed.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2001); proporcionan a un experto en la materia una guía general de muchos de los términos utilizados en la presente solicitud.

- 5 Un experto en la materia reconocerá muchos procedimientos y materiales similares o equivalentes a los que se describen en el presente documento, que podrían usarse en la puesta en práctica de las invenciones reivindicadas. De hecho, la materia objeto inventiva no debe interpretarse como limitada a los procedimientos y materiales que se describen. Para los presentes fines, los siguientes términos se definen a continuación.

- 10 A menos que el contexto dicte lo contrario, todos los intervalos establecidos en el presente documento deben interpretarse como inclusivos de sus puntos finales y los intervalos abiertos deben interpretarse como que incluyen valores comercialmente prácticos. Del mismo modo, todas las listas de valores deben considerarse como inclusivas de valores intermedios a menos que el contexto indique lo contrario.

- 15 Como se usan en el presente documento, las expresiones "Theta-defensinas" o "θ-defensinas" incluyen miembros de la familia θ-defensina de proteínas defensinas descubiertas en diversas especies de primates, tales como los monos y simios del Viejo Mundo (siendo ejemplos son el macaco de la India, el babuino oliva, el gibbon siamang y el orangután), en los que se expresan transcripcionalmente precursores de las θ-defensinas y se procesan mediante modificación postraduccional en θ-defensina. Esto incluye adicionalmente pseudogenes descubiertos en los Grandes Simios (siendo ejemplo los seres humanos, chimpancés, bonobos y gorilas), en los que la modificación genética de pseudogenes de θ-defensina puede alterarse de acuerdo con técnicas fácilmente conocidas en la técnica, para permitir la expresión de proteínas θ-defensina en células de mamífero. Esto también incluye proteínas θ-defensina que pueden identificarse en la misma especie o en especies diferentes, de acuerdo con técnicas fácilmente conocidas en la técnica, tales como técnicas de modelado por ordenador que describen la homología de secuencia o la estructura conservada en una ventana de comparación de secuencias de ácido nucleico y/o aminoácidos o técnicas de hibridación selectiva que usan sondas de ácido nucleico para identificar θ-defensinas homólogas. Las θ-defensinas pueden aislarse de fuentes endógenas, pueden producirse en estirpes celulares autólogas o heterólogas, pueden producirse por síntesis de péptidos o de acuerdo con cualquier procedimiento disponible conocido por un experto en la materia. Los ejemplos de θ-defensinas incluyen RTD-1, RTD-2, RTD-3, RTD-4, RTD-5, RTD-6, RTD-7, RTD-8, RTD-9, RTD-10 o HTDp.

- 25 "Sheddasa", como se usa en el presente documento, incluye proteínas enzimáticas que escinden porciones extracelulares de proteínas transmembrana. Los ejemplos incluyen miembros de la familia desintegrina y metaloproteína (ADAM) de proteínas, la familia proteasa aspártica (BACE) de proteínas, entre otros. Los ejemplos de proteínas ADAM que son sheddases incluyen ADAM2, ADAM7, ADAM8, ADAM9, ADAM10, ADAM11, ADAM12, ADAM15, ADAM17, ADAM18 (también conocido como ADAM27), ADAM19, ADAM20, ADAM21 (también conocido como ADAM31), ADAM22, ADAM23, ADAM28, ADAM29, ADAM30 y ADAM33.

- 30 El término "análogo", como se aplica a las θ-defensinas en el presente documento, son polipéptidos y péptidos que contienen una estructura central derivada de una defensina, tal como θ-defensina, que es capaz de modular la actividad de las citocinas, inhibir la actividad sheddasa proteolítica, alterar la función enzimática relacionado con los receptores de la superficie celular y/o posee actividad antimicrobiana. Los ejemplos incluyen péptidos cíclicos que contienen uno, dos, tres, cuatro o más enlaces disulfuro a través de múltiples restos de cisteína o sustitutos sustancialmente similares, en los que el análogo puede variar en una longitud de 8-24 aminoácidos y contiene una carga positiva neta.

- 35 Las defensinas son proteínas catiónicas ricas en cisteína pequeñas que están altamente conservadas evolutivamente, se encuentran en vertebrados, invertebrados y plantas. Estas proteínas poseen actividad biológica contra un amplio espectro de organismos tales como bacterias, hongos y muchos virus con y sin envoltura. En general, las defensinas consisten en 18-45 aminoácidos que incluyen de 6 (en vertebrados) a 8 restos de cisteína conservados. Diversas células inmunitarias, tales como los granulocitos de neutrófilos y casi todas las células epiteliales, contienen estos péptidos como células hospedadoras, con una función clave de destrucción de microorganismos fagocitados o extracelulares. Muchas defensinas actúan uniéndose a la membrana celular microbiana y, una vez incluidas, forman defectos de membrana similares a poros que permiten el flujo de salida de iones y nutrientes esenciales para destruir la integridad de los microbios. Sin embargo, como se describe adicionalmente en el presente documento, determinados miembros de las proteínas defensinas, incluyendo las θ-defensinas, también actúan a través de la modulación de la función inmunitaria de la célula hospedadora. Esto incluye vías inflamatorias relacionadas con citocinas, tales como TNF-α.

- 40 **Defensinas, en general.** Las defensinas son péptidos antimicrobianos catiónicos que contienen trisdifuro que son producidos por leucocitos y diversos epitelios. Se subdividen en las subfamilias α-, β-, θ-defensina, que se distinguen por el tamaño del péptido y los diferentes motivos disulfuro. En seres humanos, se han aislado cuatro α-defensinas (de HNP-1 a HNP-4) de neutrófilos y dos α-defensinas entéricas (HD-5 y HD-6) son expresadas por las células de Paneth en las criptas del intestino delgado. La expresión de HD-5 también se ha detectado en el tracto urogenital femenino. Se han aislado tres β-defensinas humanas (de hBD-1 a hBD3) de tipos celulares epiteliales y no epiteliales de diversos órganos y la expresión de muchas otras se ha deducido mediante análisis de ADNc o por

análisis del genoma humano. Numerosas líneas de evidencia sugieren que las defensinas proporcionan una función efectora antimicrobiana en la piel, el epitelio respiratorio, el tracto urogenital y diversos leucocitos (es decir, neutrófilos, monocitos y linfocitos NK). Además, las defensinas activan células implicadas en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas, lo que sugiere que operan dentro y vinculan dos ramas de inmunidad.

5 **θ-Defensinas macrocíclicas.** Las θ-defensinas son octadecapéptidos cíclicos formados por el corte y empalme postraducciona de dos nonapéptidos derivados de precursores relacionados con la α-defensina de 76 aminoácidos. Los seres humanos no expresan péptidos de θ-defensina puesto que la expresión de θ-defensinas cesó cerca del tiempo en que los orangutanes emergieron en la evolución debido a una mutación que introdujo un codón de terminación prematuro en el precursor del péptido.

10 Las θ-defensinas pueden bio-sintetizarse usando corte y empalme de la cabeza a la cola de dos secuencias de 9 aminoácidos derivadas de precursores de θ-defensina. Las θ-defensinas se identificaron por primera vez en neutrófilos y monocitos del macaco de la India, con un estudio filogenético posterior que revela la existencia de genes de θ-defensina en otros monos del Viejo Mundo y dos simios (el siamang y el orangután), pero la existencia de θ-defensinas en monos y prosimios del Nuevo Mundo aún no se ha publicado. Los seres humanos, los chimpancés, los bonobos y los gorilas expresan pseudogenes de θ-defensina en los que el ARNm precursor contiene una mutación que produce un codón de terminación en la secuencia señal, evitando de este modo la traducción del precursor de θ-defensina. La θ-defensina-1 de macaco de la India (RTD-1) se produce a partir del corte y empalme heterodimérico de dos precursores de θ-defensina, proRTD1a y proRTD1b. Se revelaron reacciones homodiméricas de escisión/ligadura que implican proRTD1a y proRTD1b mediante el aislamiento de RTD-2 y RTD-3. RTD-1, -2 y -3 tienen potentes actividades microbidas contra bacterias y hongos y se sabe que poseen actividades antivíricas contra el virus de inmunodeficiencia humana de tipo 1 (VIH-1) y el virus del herpes simple (HSV).

Los inventores han creado diseños sintéticos de θ-defensina basados en la secuencia de una θ-defensina natural que posee actividades antibacterianas y antivíricas. Además, se ha publicado que las θ-defensinas se unen e inactivan la toxina letal de *Bacillus anthracis*. Las θ-defensinas son microbidas en presencia de concentraciones fisiológicas de sal, cationes divalentes y suero. Por el contrario, las actividades antimicrobianas de las α y β-defensinas se reducen notablemente en presencia de sal y cationes divalentes. La RTD-1 acíclica es inactiva contra *Staphylococcus aureus* en solución salina fisiológica, mientras que la forma cíclica natural del péptido retuvo una potente actividad de destrucción en estas condiciones. Estos datos indican que la estructura de cadena principal cíclica de θ-defensinas confiere insensibilidad a la sal, proporcionando al mismo tiempo una molécula estable capaz de retener la actividad biológicamente potente en condiciones fisiológicamente pertinentes.

25 **Actividad antimicrobiana de θ-defensinas.** El péptido θ-defensina arquetípico es θ-defensina-1 de macaco de la India (RTD-1), un péptido macrocíclico de 18 aminoácidos. Como se describe, el péptido maduro se produce mediante un procedimiento único por el que dos péptidos de 9 aminoácidos, derivados de precursores similares a α-defensina truncados, se cortan y empalman de cabeza a cola para formar una molécula macrocíclica estabilizada por tres disulfuros (Fig. 1). La vía biosintética que da origen a la θ-defensina madura macrocíclica es novedosa. Los macacos de la India y los babuinos Oliva expresan 3 y 4 precursores de θ-defensina, respectivamente. Cada precursor dona un único nonapéptido que se aparea con un nonapéptido idéntico (corte y empalme homodimérico) o diferente (corte y empalme heterodimérico) en todas las combinaciones binarias. Esto permite la producción de 6 θ-defensinas de macaco únicas y 10 θ-defensinas de babuino. Los inventores han aislado los seis péptidos de macaco predichos y han aislado siete de los predichos en babuino.

Al igual que otras defensinas, tales como las α-defensinas, las θ-defensinas se empaquetan en los gránulos primarios de neutrófilos de macacos y babuinos y también se expresan en monocitos. Como los microbios son fagocitados por neutrófilos, monocitos y macrófagos, las defensinas se movilizan al fagosoma donde participan en la destrucción intracelular como microbidas. Las θ-defensinas son microbidas a concentraciones submicromolares contra bacterias grampositivas y hongos e inhiben la captación celular del VIH-1. Usando un anticuerpo neutralizante específico, los inventores han demostrado que las θ-defensinas son responsables de la mayor parte de las actividades antimicrobianas derivadas de gránulos de los neutrófilos de macaco contra *S. aureus*, *E. coli* y *C. albicans in vitro*. Además, se demostró que las θ-defensinas son responsables de las actividades de destrucción superiores de los extractos de gránulos de PMN de macaco en comparación con los extractos de gránulos de neutrófilos humanos. Durante la inflamación sistémica (por ejemplo, sepsis) en seres humanos, las α-defensinas se liberan de manera dirigida y/o accidental al espacio extracelular. Se liberan θ-defensinas de babuino de forma similar en el suero de animales bacterémicos. Adicionalmente, las α-defensinas extracelulares parecen poseer la capacidad de modular la inflamación a través de mecanismos antiinflamatorios que son operativos en especies que van desde los roedores a los seres humanos, como se describe adicionalmente en el presente documento. Por tanto, las θ-defensinas y los péptidos derivados de la estructura de θ-defensinas, representan una clase importante de moduladores de función inmunitaria.

50 **TNF-α e inflamación.** El factor de necrosis tumoral alfa ("TNF-α", también conocido como caquexina o caquectina) es una citocina implicada en la inflamación sistémica y es miembro de un grupo de citocinas que estimulan la reacción de fase aguda.

El TNF- α desempeña un papel clave en la regulación de las células inmunitarias, incluyendo la inducción de la muerte celular apoptótica, la promoción de la inflamación, la inhibición de la oncogénesis y la replicación vírica. Dada la amplia gama de efectos de la actividad de TNF- α , no es sorprendente encontrar que se ha implicado la desregulación de la expresión, producción y señalización de TNF- α en una diversidad de enfermedades humanas, incluyendo la artritis reumatoide, la enfermedad de Alzheimer, la tuberculosis, la enfermedad de Crohn, entre muchas otras.

La señalización de TNF- α se produce en primer lugar como una proteína transmembrana de tipo II de 26 kDa y 212 aminoácidos de longitud que se inserta en la membrana celular durante la maduración. En la superficie celular, el TNF- α unido a la membrana ("pro-TNF- α ") es biológicamente activo y es capaz de inducir respuestas inmunitarias a través de la señalización intercelular yuxtacrina. Sin embargo, el pro-TNF- α puede experimentar una escisión proteolítica en su enlace amida Ala76-Val77 por la metaloproteinasa enzima convertidora de TNF- α ("TACE", también conocida como ADAM17). A partir de esta forma integrada en la membrana, se libera el dominio extracelular soluble de 17 kDa (ectodominio), habitualmente conocido como TNF- α , que es de vital importancia en la señalización paracrina.

En general, las estrategias terapéuticas existentes que tienen como diana la actividad de TNF- α se han centrado en proporcionar anticuerpos contra formas solubles y/o unidas a transmembrana de TNF- α para evitar la unión del receptor o crear receptores de fusión híbridos solubles para neutralizar los niveles circulantes de TNF- α . A pesar de los importantes beneficios de estos enfoques terapéuticos, casi 1/3 de los pacientes no responden a ninguna forma de terapia anti-TNF- α , aunque se han informado varios efectos adversos, incluyendo inmunogenia, infecciones, reacciones de tipo hipersensibilidad retardada y enfermedades autoinmunitarias tales como lupus inducido por fármacos y desmielinización.

Actividad de TACE y Sheddasa. Como se describe, una etapa clave en la actividad de señalización de TNF- α es la liberación de la forma unida a la membrana de la proteína en una forma soluble de TNF- α circulante, catalizada por TACE, un proceso conocido como "desprendimiento". TACE, una proteína de 70 kDa compuesta por 824 aminoácidos, pertenece a la familia de proteínas ADAM de desintegrinas y metaloproteinasas (una desintegrina y metaloproteinasa). Los miembros de la familia de proteínas ADAM poseen estructuras conservadas evolutivamente y capacidad funcional de escisión y liberación de un ectodominio soluble a partir de proproteínas unidas a la membrana. Dado el papel del TNF- α como mediador potente y fundamental en el proceso inflamatorio, los péptidos cíclicos que funcionan como inhibidores de TACE ofrecerían una alternativa vital a los agentes anti-TNF- α actuales, tales como los anticuerpos o las composiciones basadas en receptores solubles.

Adicionalmente, TNF- α y TACE representan solo dos de varias dianas terapéuticas potenciales para la actividad terapéutica de péptidos cíclicos, dada la amplitud y diversidad de la actividad de "desprendimiento" en varias proteínas diferentes y la aplicación en muchas patologías y/o afecciones diferentes. TACE y otras moléculas de la familia ADAM constituyen la mayor parte de los miembros de la familia más grande de "sheddasas". Sin embargo, otras sheddasas incluyen miembros de las familias de proteínas aspártico proteasa (BACE). Más allá de la amplitud de los tipos de sheddasas, la función de la actividad sheddasa varía desde la activación de la señalización a través de la escisión de un ectodominio del receptor de proteína transmembrana (por ejemplo, Her2) o después de la unión del agonista al receptor para permitir que el agonista liberado estimule adicionalmente otro receptor (por ejemplo, EGFR). Debido a este papel vital en la habilitación y la propagación de la función de señalización, la inhibición de la actividad sheddasa proporciona una estrategia terapéutica importante para abrir nuevas vías terapéuticas y también para potenciar la eficacia de los tratamientos farmacológicos existentes. Por ejemplo, la escisión por la sheddasa ADAM10 de Her2 conduce a un fragmento de Her2 que posee actividad cinasa constitutiva con señales de crecimiento y supervivencia independientes de ligando para células en proliferación. Los efectos nocivos de este proceso pueden verse obstaculizados por la administración de trastuzumab (herceptin) y la inhibición de la actividad sheddasa de ADAM 10. Como resultado, pueden usarse péptidos cíclicos para limitar la actividad dañina de las citocinas en relación con la función inmunitaria, abriendo al mismo tiempo oportunidades terapéuticas aún más amplias para enfermedades tales como el cáncer u otras enfermedades y/o afecciones que implican la disfunción de las sheddasas. Este aspecto de las θ -defensinas como poseedoras de una actividad inhibidora de sheddasas endógenas, puede justificar un número de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias y otras afecciones en sujetos humanos, debido a la pérdida de expresión de θ -defensinas durante la evolución de los primates. Por tanto, las θ -defensinas y los péptidos cíclicos derivados de la estructura de diversas θ -defensinas, pueden usarse como agentes terapéuticos compatibles en sujetos humanos afectados por enfermedades y afecciones asociadas a la desregulación de metaloproteinasas.

La materia objeto inventiva proporciona péptidos cíclicos. El péptido cíclico es una θ -defensina o un análogo de la misma.

En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se expresa endógenamente en un primate. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se expresa endógenamente en un macaco de la India. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina es RTD-1, RTD-2, RTD-3, RTD-4, RTD-5 o RTD-6. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se expresa endógenamente en un babuino oliva. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina es BTD-1, BTD-2, BTD-3, BTD-4, BTD-5, BTD-6, BTD-7, BTD-8, BTD-9 o BTD-10. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se expresa endógenamente en un ser humano. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina es un pseudogén de θ -defensina

humana (HTDP). En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se expresa en un siamang u orangután.

En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se aísla a partir de un mamífero. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se aísla a partir de un primate. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se aísla a partir de un ser humano. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se purifica a partir de una muestra biológica obtenida de un mamífero. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se purifica a partir de una muestra biológica obtenida de un primate. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina se purifica a partir de una muestra biológica obtenida de un ser humano.

En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene más de 24 aminoácidos de longitud. En una realización particular, el péptido cíclico tiene 14 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene 4 restos de cisteína que forman 2 enlaces disulfuro. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene 6 restos de cisteína que forman 3 enlaces disulfuro. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico incluye un aminoácido sintético. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene una carga positiva neta. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico puede estar codificado por un polinucleótido que posee menos de aproximadamente el 20 %, el 25 %, el 30 %, el 35 %, el 40 %, el 45 %, el 50 %, el 55 %, el 60 %, el 65 %, el 70 %, el 75 %, el 80 %, el 85 % o más de porcentaje de identidad a la SEQ. NO. 1, SEQ. NO. 2, SEQ. NO. 3, SEQ. NO. 4, SEQ. NO. 5, SEQ. NO. 6, y/o SEQ. NO. 7. Un experto habitual en la materia puede establecer el porcentaje de identidad de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica, incluyendo el establecimiento de una ventana de comparación entre una secuencia de referencia y una segunda secuencia de polinucleótidos, para establecer el grado de porcentaje de identidad.

En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico modula la inflamación. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico modula la actividad de una citocina y/o quimiocina. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico modula la actividad de TNF- α . En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico modula la actividad del TNF- α a través de la inhibición competitiva con un miembro de la familia de las desintegrinas y las metaloproteinasas. En otra clase de realizaciones, el miembro de la familia de las desintegrinas y las metaloproteinasas es una sheddasa. En otra clase de realizaciones, la sheddasa es TACE. En otra clase de realizaciones, la sheddasa es ADAM10. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico es capaz de modular la actividad enzimática proteolítica. Se desvelan péptidos cíclicos capaces de la destrucción antimicrobiana.

La materia objeto de la invención proporciona un péptido cíclico para su uso en el tratamiento de una enfermedad y/o afección inflamatoria crónica que incluye las etapas de proporcionar una cantidad de péptido cíclico, administrar la cantidad de péptido cíclico a un sujeto que necesita tratamiento para una enfermedad y/o afección inflamatoria, en la que el péptido cíclico es capaz de modular la inflamación, tratando de este modo al sujeto. El péptido cíclico es una θ -defensina, un análogo o un derivado de la misma. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina es RTD-1, RTD-2, RTD-3, RTD-4, RTD-5, RTD-6, BTD-1, BTD-2, BTD-3, BTD-4, BTD-5, BTD-6, BTD-7, BTD-8, BTD-9 o BTD-10. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene más de 24 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene 14 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene al menos 4 restos de cisteína que forman dos o más enlaces disulfuro. En otra clase de realizaciones, la cantidad del péptido cíclico administrado es una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido cíclico. En otra clase de realizaciones, el sujeto es un mamífero. En otra clase de realizaciones, el sujeto es un ser humano.

La enfermedad y/o afección inflamatoria es la inflamación crónica o una enfermedad autoinmunitaria. En otra clase de realizaciones, la enfermedad y/o afección inflamatoria se relaciona con la actividad de una citocina o quimiocina. En otra clase de realizaciones, la enfermedad y/o afección inflamatoria se relaciona con la actividad de TNF- α . En otra clase de realizaciones, la enfermedad y/o afección inflamatoria es artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.

El péptido cíclico es una θ -defensina, un análogo o un derivado de la misma. En otra clase de realizaciones, la θ -defensina es RTD-1, RTD-2, RTD-3, RTD-4, RTD-5, RTD-6, BTD-1, BTD-2, BTD-3, BTD-4, BTD-5, BTD-6, BTD-7, BTD-8, BTD-9 o BTD-10. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o 24 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico tiene 14 aminoácidos de longitud. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene al menos 2 restos de cisteína que forman un enlace disulfuro. En otra clase de realizaciones, el péptido cíclico contiene al menos 4 restos de cisteína que forman dos o más enlaces disulfuro. En otra realización, el procedimiento de fabricación incluye las etapas de síntesis de péptidos usando síntesis en fase líquida o síntesis en fase sólida. En otra clase de realizaciones, la síntesis en fase sólida es la síntesis por Fmoc o BOC.

La fabricación de las composiciones contempladas en el presente documento puede realizarse de cualquier manera adecuada, incluyendo, por ejemplo, el uso de vectores de expresión. Un experto habitual puede elegir un vector de expresión adecuado y reconocerá que hay un gran número de opciones. Muchos de estos vectores usan promotores

víricos. Muchas opciones de estirpes celulares son adecuadas para la célula hospedadora, incluyendo, por ejemplo, bacterias, levaduras, células de insectos y plantas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 - Propiedades únicas de las θ -defensinas pleiotrópicas y propiedades antiinflamatorias.

Las θ -defensinas destruyen células de *E. coli* mediante la generación de pequeños poros en la envoltura celular que media su propia captación. En este estudio, los inventores hicieron el notable descubrimiento de que, a diferencia de muchas α y β -defensinas, las θ -defensinas no son tóxicas para las células hospedadoras y pueden administrarse por diversas vías a los ratones. En este sentido, los ratones toleran fácilmente la administración i.v. de al menos dosis de 80 mg/kg de tres θ -defensinas diferentes. Los inventores también han administrado RTD-1 en dosis i.v. crecientes (máximo de 3 mg/kg) a dos chimpancés adultos. No se observó toxicidad clínica en ningún punto y todos los valores de laboratorio de bioquímica clínica y hematológicos estuvieron dentro de los límites normales después de todas las inyecciones. Ninguno de los animales produjo un anticuerpo contra RTD-1, demostrando de este modo una notable falta de toxicidad e inmunogenia en diferentes especies de mamíferos. Basándose en estos y otros datos, se sometió a ensayo la eficacia de RTD-1 en un modelo de ratón de sepsis grave inducida por ligadura y punción cecal (LPC). Como se muestra en la Fig. 2, una única inyección de RTD-1 (5 mg/kg) redujo notablemente la muerte en ratones BALB/c cuando el péptido se administró 4 o 24 h *después* de la cirugía de LPC ($P < 0,01$ en los días 4 y 7). Los supervivientes el día 7 fueron clínicamente normales hasta el día 15, momento en el que fueron sacrificados. Este efecto terapéutico de las θ -defensinas en la sepsis por LPC fue altamente reproducible (experimentos $N = 5$). Sin embargo, el alto grado de eficacia de las θ -defensinas sugirió que la eficacia de RTD-1 en este modelo *no* estuvo principalmente por un efecto antibiótico, puesto que el microbioma en la sepsis polimicrobiana es enorme. Más bien, se creyó que la potencia del efecto terapéutico demostrado estaba mediada adicionalmente por un mecanismo antiinflamatorio. Para explorar esta posibilidad, los inventores realizaron experimentos adicionales, en los que el tratamiento con RTD-1 de ratones LPC estuvo acompañado de reducciones marcadas en una amplia diversidad de citocinas proinflamatorias en suero, incluyendo TNF- α , IL-6 y MIF.

Otros estudios han demostrado que los AMP naturales o modificados por ingeniería genética son eficaces en modelos de sepsis en roedores. En cada caso, el mecanismo protector aparente era la unión del LPS bacteriano mediante el péptido, evitando de este modo la interacción con proteínas de la célula hospedadora (proteína de unión a LPS) o receptores (TLR-4, CD14). En este sentido, se ha demostrado que casi todos los AMP analizados se unen y neutralizan el LPS, lo que respalda la conclusión de que este es el mecanismo principal que media sus actividades antisépticas.

Sin embargo, las θ -defensinas son menos eficaces para neutralizar directamente el LPS, siendo 100 veces menos activas que la polimixina B en la neutralización de endotoxinas. Más bien, como se analiza a continuación, los estudios demuestran que las θ -defensinas poseen varias capacidades funcionales, incluyendo un medio primario de modulación de la inflamación por interacciones con células hospedadoras. Este hallazgo es coherente con estudios anteriores en los que se evaluó la eficacia de RTD-1 en un modelo en ratón de neumonitis por SARS-coronavirus (SARS-CoV). En este estudio, los inventores descubrieron que la administración intranasal de RTD-1 era eficaz al 100 % en la prevención de la muerte de ratones infectados con virus. Significativamente, RTD-1 no fue viricida contra el SARS-CoV. Sin embargo, la administración de péptidos redujo la inflamación pulmonar y la expresión de varias citocinas proinflamatorias, sugiriendo de este modo que el efecto terapéutico estaba mediado por las propiedades antiinflamatorias de la RTD-1. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, la creencia de los inventores de que las θ -defensinas modulan las respuestas del hospedador a los estímulos proinflamatorios se confirmó mediante experimentos adicionales que demuestran que RTD-1 es terapéuticamente eficaz en la artritis inducida por pristano en la rata (Fig. 9; analizada a continuación) y en la artritis inducida por colágeno.

Ejemplo 2 - La actividad de RTD-1 está mediada por la interacción con las células hospedadoras en lugar del efecto antimicrobiano.

Varias líneas de datos demuestran que la θ -defensina arquetípica, RTD-1, ejerce sus efectos antiinflamatorios mediante la interacción con las células hospedadoras en lugar de a través de un efecto antimicrobiano. Estos hallazgos condujeron a experimentos adicionales que evaluaban el efecto de las RTD en la producción de TNF- α por sangre entera humana estimulada con *E. coli* o *S. aureus*. Un experimento representativo, que se muestra en la Figura 4 (B y C), demuestra que las RTD 1-5 (Fig. 4A) inhiben la liberación de TNF- α inducida por *E. coli*; nótese que incluso entre diferentes θ -defensinas hay una potencia inhibidora notablemente diferente entre ellas. Se obtuvieron resultados similares en experimentos con *S. aureus*. En experimentos de control, los inventores descubrieron que, a diferencia de muchas otras defensinas, las θ -defensinas no interactúan directamente con la proteína TNF- α , basándose en los resultados que demuestran que los péptidos no alteran las curvas convencionales de ELISA y el inmunoensayo solo detecta TNF- α trimérico activo. Los resultados de estos y otros experimentos sugirieron que los efectos protectores de RTD-1 en la sepsis por LPC (Fig. 3) se debieron a actividades inmunomoduladoras más que a un efecto antimicrobiano. Tras este resultado, los inventores estimularon leucocitos de sangre periférica humana (LSP) con agonistas para TLR 1-9 durante 4 h con o sin adición simultánea de 10 μ g/ml de RTD-1. Como se muestra en la Fig. 5, la coincubación de LSP con RTD-1 redujo notablemente la liberación de TNF- α inducida por agonistas para TLR 2, 4, 5 y 8. Además, RTD-1 también inhibió la liberación de IL-1 β e IL-6 estimulada por cada agonista y la

IL-8 se inhibió fuertemente en todas las inducciones excepto en presencia del agonista TLR2. RTD-1 no tuvo esencialmente ningún efecto sobre las células no estimuladas (Fig. 5, panel superior izquierdo). El efecto del tratamiento con RTD-1 sobre los niveles de MCP-1 varió. Los inventores incluyeron esta quimiocina en el análisis porque en la neumonitis por SARS murino, RTD-1 redujo notablemente los niveles de MCP-1 pulmonar. Esto está de acuerdo con el efecto de RTD-1 en los LSP estimulados con ARNm vírico (Fig. 5). Finalmente, los inventores descubrieron adicionalmente que RTD-1 suprimía la expresión (reducción >85 %) de IL-17A por CMSP humanas estimuladas *ex vivo* con *S. aureus* productor de enterotoxina de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo 3 - Inhibición de TACE por θ -defensinas

Puesto que estos resultados demuestran la inhibición de TNF- α mediada por θ -defensinas inducida por bacterias (Fig. 4), diversos agonistas de TLR (Fig. 5), y que se mide en animales (véase anteriormente), un posible mecanismo de acción era que la actividad de la enzima convertidora de TNF- α podría ser antagonizada por θ -defensinas. Esta enzima convertidora de TNF- α ("TACE", también conocida como ADAM17, un miembro de la familia ADAM (una desintegrina y metaloproteína)), es una sheddasa responsable de la liberación de TNF- α unido a la membrana. Sorprendentemente, los inventores descubrieron que RTD-1 es un inhibidor potente de TACE recombinante (rTACE) con una CI₅₀ de ~0,1 μ g/ml (48 nM). Cabe destacar que ninguna α -defensina humana (HNP-2, HNP-4) inhibió la rTACE (Fig. 6A), lo que hace que la actividad de la θ -defensina sea única entre las defensinas. Las actividades inhibidoras relativas de θ -defensinas naturales (RTD 1-5; estructuras en la Fig. 4A) se sometieron a ensayo y se descubrió que varían en un intervalo de ~10 veces los valores de CI₅₀ (Fig. 6B). Cabe destacar que la jerarquía de la inhibición de TACE por RTD 1-5 se correlacionó bien con la inhibición de TNF- α por los péptidos en sangre humana (Fig. 4C). La inhibición de TACE por RTD-1 no se potenció 15 minutos antes de la incubación con TACE, un hallazgo que sugiere una unión rápida e inhibición competitiva. Esto se confirmó mediante un análisis de gráfico doble recíproco de datos cinéticos enzimáticos (Fig. 6C), lo que indica que RTD-1 actúa como un pseudosustrato para TACE. Un análogo de cadena abierta de RTD-1 (S-7; Fig. 6D) se sometió a ensayo para la inhibición de TACE y se descubrió que tenía menos del 20 % de la actividad de RTD-1, lo que indica que se requiere la conformación cíclica para la inhibición eficaz de TACE (Fig. 6E).

La inhibición de TACE se confirmó adicionalmente en un ensayo en células. Se demostró que RTD-1 inhibía la TACE expresada en células THP-1 en reposo y estimuladas con LPS (Fig. 6F) usando una modificación del ensayo descrito por Alvarez-Iglesias y col. La CI₅₀ obtenida para RTD-1 en los ensayos en células fue de ~15 μ g/ml (7,4 μ M). Esto se compara favorablemente con la CI₅₀ del inhibidor de TACE de molécula pequeña GM6001 (5,5 +/- 3 μ M) en un estudio de bloqueo de TACE en células THP-1.

Ejemplo 4 - Las θ -defensinas inhiben ADAM10

Se han implicado diversas ADAM como sheddases reguladoras que liberan factores de crecimiento, citocinas y receptores anclados a la membrana. Debido a que las ADAM están implicados en muchos procesos biológicos clave, incluyendo la regulación de la inflamación y el cáncer, la identificación de inhibidores de ADAM es un área intensa de investigación. Los inventores establecieron que las θ -defensinas naturales RTD 1-3 inhiben ADAM10 (Fig. 7) con aproximadamente la misma CI₅₀ observada con la inhibición de TACE (véase la Fig. 6). Por tanto, las θ -defensinas son inhibidores de metaloproteasas de al menos dos ADAM.

Ejemplo 5 - Anti-TNF- α e inhibición de TACE por mini- θ -defensinas

Los análisis de estructura-actividad de θ -defensinas naturales y modificadas sugirieron determinadas características de secuencia que predijeron la mediación de los efectos antiinflamatorios de estos péptidos. Como ejemplo, se diseñaron tres tetradecapéptidos (mini- θ -defensinas) para que contuvieran características consideradas importantes para las propiedades antiinflamatorias de las θ -defensinas naturales. Estos se incorporaron en las secuencias de los péptidos que se muestran en la Fig. 8A. Se evaluó cada péptido para determinar su eficacia en la sepsis por LPC murina. Como se muestra en la Fig. 8B, las tres mini- θ -defensinas redujeron la letalidad en ratones en comparación con el tratamiento simulado con PBS. Los inventores evaluaron adicionalmente cada mini- θ -defensina para determinar su efecto sobre la liberación de TNF- α de sangre humana estimulada (Fig. 8C) y para determinar su actividad inhibidora contra TACE (Fig. 8D). Como muestran los datos en la Figura 8, las mini- θ -defensinas tenían una actividad similar o superior a RTD-1 en el ensayo de LPC (compárese con la Fig. 3), el ensayo de inhibición de TNF- α (Fig. 8C) o el ensayo de inhibición de TACE (Fig. 8D).

El péptido θ -defensina maduro RTD-1 es una lámina-beta bicatenaria que, como las α y β -defensinas, se estabiliza por tres disulfuros. Sin embargo, la orientación paralela de la disposición de disulfuro de RTD-1 permite una flexibilidad sustancial alrededor de su eje corto. A diferencia de una α y β -defensina, RTD-1 carece de una topología anfífila y, sin quedar ligado a teoría alguna, esta y otras diferencias estructurales similares pueden explicar las capacidades inmunomoduladoras únicas de las θ -defensinas.

Ejemplo 6 - Eficacia de la θ -defensina en la artritis inducida por pristano en rata (AIP)

Si el bloqueo de TNF- α por θ -defensina *in vivo* o *ex vivo* es fundamental para los efectos antiinflamatorios del péptido, los inventores creyeron que debería modular el curso de una enfermedad que se sabe que es impulsada por TNF- α . Los inventores procedieron a someter a ensayo el efecto de RTD-1 en ratas con AIP establecida. En un

experimento representativo (N = 3), se inyectaron por vía subcutánea ratas adultas Dark Agouti (DA; cepa OlaHsd) (N = 21) con 0,3 ml de pristano el día 0 según describen Vingsbo y col. Al primer signo de enfermedad clínica (14 - 21 días; basándose en la escala de patología macroscópica de Brand y col., los animales se asignaron alternadamente a grupos de tratamiento con solución salina (N = 10) o RTD-1 (N = 11). La administración ciega de solución salina (0,2 - 0,25 ml) o RTD-1 (5 mg/kg en 0,2 - 0,25 ml de solución salina) se realizó mediante inyección diaria en la vena de la cola durante hasta 14 días a menos que la gravedad de la artritis (puntuada ciegamente cada día durante hasta 36 días por tres observadores) regresase a cero antes (N = 1 en el grupo de solución salina; N = 8 en el grupo de RTD-1). Los animales tratados con RTD-1 tuvieron una reducción estadísticamente significativa (* = $p \leq 0,05$ mediante el ensayo de T de Student de dos colas sin aparear) de la patología articular comenzando el día 7; Fig. 9. También se demostró la eficacia en este modelo mediante inyección subcutánea de la misma dosis y formulación de RTD = 1. Después del cese del tratamiento no hubo evidencia de reaparición de la enfermedad durante al menos 45 días.

Ejemplo 7 - Las θ -defensinas son altamente estables

La θ -defensina RTD-1 se incubó a 50 μ g/ml en plasma humano, suero humano o albúmina sérica humana 50 mg/ml durante 72 horas a temperatura ambiente. Se realizó un análisis cuantitativo por HPLC que mostró que más del 95 % del péptido estaba inalterado en cada una de las condiciones sometida a ensayo. Además, las θ -defensinas son estables al almacenamiento prolongado en condiciones de pH bajo ($\sim$ pH 7,5) o neutro (pH 7,4).

En resumen, las θ -defensinas poseen propiedades antiinflamatorias que están mediadas por el bloqueo de proteasas proinflamatorias tales como TACE y otras metaloenzimas. Son eficaces en modelos animales de enfermedades inflamatorias infecciosas y no infecciosas, son bien toleradas cuando se administran por vía sistémica y no son inmunógenas. Además, a diferencia de otros agentes antiinflamatorios, las θ -defensinas no son inmunosupresoras.

Composiciones farmacológicas, dosificaciones, formas de dosificación y vías de administración

Las composiciones de acuerdo con la materia objeto inventiva pueden administrarse usando diversas vías, incluyendo por vía oral, por vía parenteral, por inhalación, por vía tópica, por vía rectal, por vía nasal o a través de un depósito implantado, en las que el término "parenteral" como se usa en el presente documento incluye la administración (normalmente inyección o infusión) subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intrasinovial, intratecal, intrahepática, intralesional e intracraneal. Preferentemente, las composiciones se administran por vía oral, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal o por vía intravenosa.

Por ejemplo, las formas inyectables estériles de los compuestos contemplados pueden ser soluciones acuosas o suspensiones oleaginosas. Estas suspensiones pueden formularse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica usando agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede prepararse como una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre otros vehículos y disolventes aceptables, los líquidos especialmente contemplados incluyen agua, solución de Ringer y solución isotónica de cloruro de sodio. Además, pueden emplearse aceites no volátiles estériles como cosolvente o medio de suspensión (por ejemplo, mono o diglicéridos sintéticos o naturales). También pueden usarse ácidos grasos y los ácidos grasos adecuados incluyen ácido oleico y sus derivados de glicéridos, aceite de oliva, aceite de ricino, especialmente en sus versiones polioxietiladas. Dichas soluciones o suspensiones de aceite pueden contener adicionalmente un diluyente o dispersante de alcohol de cadena larga.

En otro ejemplo, los compuestos contemplados pueden administrarse por vía oral en cualquier forma de dosificación aceptable por vía oral, incluyendo cápsulas, comprimidos, suspensiones o soluciones acuosas. En el caso de los comprimidos para su uso oral, todos los vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, lactosa, almidón de maíz, etc.) se consideran adecuados. De forma similar, pueden añadirse diversos agentes lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio). Para la administración oral en forma de cápsula, los diluyentes útiles incluyen lactosa y almidón de maíz seco. Cuando se requieren suspensiones acuosas para su uso oral, el principio activo se combina con agentes emulsionantes y de suspensión. Si se desea, también pueden añadirse determinados agentes edulcorantes, aromatizantes o colorantes.

Se contempla que las composiciones farmacéuticas de la materia objeto inventiva puedan administrarse por vía tópica, especialmente cuando el objetivo del tratamiento incluye áreas u órganos fácilmente accesibles por aplicación tópica, incluyendo enfermedades del ojo, la piel, el tracto intestinal inferior o áreas expuestas durante la intervención quirúrgica. Existen numerosas formulaciones tópicas conocidas en la técnica y todas estas formulaciones se consideran adecuadas para su uso en el presente documento.

Para aplicaciones tópicas, las composiciones contempladas pueden formularse en una pomada adecuada que contenga el componente activo suspendido o disuelto en uno o más vehículos. Los vehículos para la administración tópica de los compuestos de la materia objeto inventiva incluyen aceite mineral, vaselina líquida, vaselina blanca, propilenglicol, polioxietileno, compuesto de polioxipropileno, cera emulsionante y agua. Como alternativa, las composiciones farmacéuticas pueden formularse en una loción o crema adecuada que contenga los componentes

activos suspendidos o disueltos en uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Los vehículos adecuados incluyen aceite mineral, monoestearato de sorbitano, polisorbato 60, cera de ésteres cetílicos, alcohol cetearílico, 2-octildodecanol, alcohol bencílico y agua.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la materia objeto inventiva también pueden administrarse mediante aerosol nasal o inhalación. Dichas composiciones se preparan de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica de formulación farmacéutica y pueden prepararse como soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar la biodisponibilidad, fluorocarbonos y/u otros agentes solubilizantes o dispersantes convencionales.

10 Con respecto a la cantidad de compuestos contemplados en la composición, debe reconocerse que la cantidad particular dependerá normalmente de la formulación específica, el principio activo y el fin deseado. Por tanto, debe reconocerse que la cantidad de compuestos contemplados variará significativamente. Sin embargo, generalmente se prefiere que los compuestos estén presentes en una cantidad mínima eficaz para entregar un efecto terapéutico y/o para visualizarse *in vitro* y/o *in vivo*.

15 Por tanto, en las formulaciones líquidas más preferidas, los compuestos contemplados estarán presentes en una cantidad de entre aproximadamente 20 mg/ml y aproximadamente 30 mg/ml, más normalmente en una cantidad de entre aproximadamente 24 mg/ml y aproximadamente 26 mg/ml y mucho más de aproximadamente 25 mg/ml. Cuando la formulación es un sólido o un gel, los compuestos contemplados estarán presentes en una cantidad de entre aproximadamente 1 mg/g y aproximadamente 100 mg/g. Con respecto a una unidad de dosificación, generalmente se contempla que los compuestos contemplados se administren a una dosificación eficaz para conseguir un efecto terapéutico deseado o a una dosificación eficaz para proporcionar visualización *in vitro* y/o *in vivo*.

Para los mamíferos humanos y no humanos, la dosificación adecuada de los compuestos contemplados debe estar en el intervalo de aproximadamente 1-10 mg/kg.

25 En el tratamiento y/o la profilaxis de enfermedades inflamatorias, generalmente se prefiere que los compuestos o composiciones de acuerdo con la materia objeto inventiva se formulen de una manera farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones adecuadas incluirán preferentemente preparaciones líquidas para la inyección en la cámara anterior y/o posterior del ojo, o para inyección en los canales semicirculares, la cóclea y/o el laberinto óseo del hueso temporal. Como alternativa o adicionalmente, los vehículos implantables (por ejemplo, biodegradables/disolventes) pueden formularse de manera que el vehículo comprenda cantidades terapéuticamente eficaces del compuesto o composición y de manera que el vehículo pueda liberar el compuesto o composición de una manera controlada y predeterminada. Entre otros vehículos adecuados, la liberación puede depender del tiempo y/o iniciarse por irradiación con luz de una o más longitudes de onda.

35 Se contempla que las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la materia objeto inventiva comprendan al menos uno de los compuestos contemplados (por ejemplo, uno o más de RTD-1-27, RTD-1-28 y RTD-1-29) junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del uso particular, debe reconocerse que la formulación, vía y/o pauta de administración pueden variar considerablemente y se contempla en general que la formulación, vía y/o administración específicas no se limiten a la materia objeto inventiva.

40 Sin embargo, debe apreciarse que la dosis administrada de la composición farmacéutica variará considerablemente y una dosis particular dependerá al menos en parte de (a) la cantidad de principio activo que sea eficaz para conseguir una respuesta terapéutica deseada, (b) la formulación de los compuestos contemplados, (c) la vía de administración, (d) la propiedad farmacocinética y farmacodinámica del compuesto contemplado y (e) otros factores, incluyendo la edad, el sexo, el peso, la salud general y el historial médico previo del paciente que se está tratando. Un experto habitual en la materia puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica requerida. Por ejemplo, un médico podría comenzar a administrar dosis a un paciente a niveles inferiores a los normalmente requeridos para un efecto terapéutico deseado y después aumentar la dosis hasta que se consiga el efecto deseado.

45 Generalmente se contempla que los compuestos de acuerdo con la materia objeto inventiva se puedan preparar en una formulación para el uso parenteral y, especialmente, las formulaciones parenterales contempladas serán formulaciones líquidas para inyección. Por tanto, las formulaciones apropiadas generalmente incluirán un disolvente farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución isotónica acuosa o no acuosa estéril) y pueden prepararse como una dispersión, suspensión o emulsión. Como alternativa, las formulaciones parenterales también pueden proporcionarse en forma de un kit que incluye compuestos contemplados y otros componentes que pueden reconstituirse en un producto líquido antes de su uso. En aspectos adicionalmente contemplados, los compuestos de acuerdo con la materia objeto inventiva también pueden administrarse como ácido nucleico recombinante de una manera que permita la expresión del compuesto en una célula hospedadora. Por ejemplo, los ácidos nucleicos recombinantes pueden proporcionarse al tejido diana a través de vectores adenovíricos, transfección usando lípidos o liposomas, electroporación u otras formas bien conocidas en la técnica.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones

farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, etc.) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Más normalmente, los fluidos adecuados son estériles y se tamponan para mantener un pH apropiado para la estabilidad del principio activo y el sitio de inyección u otro uso.

Los compuestos contemplados pueden prepararse en forma de sal o sales farmacéuticamente aceptables, que incluyen especialmente sales de grupos ácidos o básicos que pueden estar presentes en los compuestos contemplados. Por ejemplo, los compuestos contemplados que son de naturaleza básica pueden formar una amplia diversidad de sales con diversos ácidos inorgánicos y orgánicos. Los ácidos adecuados proporcionarán aniones farmacológicamente aceptables, incluyendo aniones cloruro, bromuro, yoduro, nitrato, sulfato, bisulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartrato, pantotenato, bitartrato, ascorbato, succinato, maleato, gentisinato, fumarato, gluconato, glucaronato, sacarato, formiato, benzoato, glutamato, metanosulfonato, etanosulfonato, bencenosulfonato, p-toluenosulfonato y pamoato [1,1'-metilen-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)]. De forma similar, los compuestos que son de naturaleza ácida pueden formar sales básicas con diversos cationes farmacológicamente aceptables y los cationes especialmente adecuados incluyen iones de metales alcalinos o alcalinotérreos (por ejemplo, cationes de sodio y potasio).

Adicionalmente incluso se contempla especialmente que los compuestos de acuerdo con la materia objeto inventiva también pueden prepararse como profármacos y todas las formas y tipos de profármacos conocidos se consideran adecuados para su uso en el presente documento, a condición de que dicho profármaco aumente la concentración del fármaco (o metabolito del profármaco) en un órgano diana o célula diana.

Por ejemplo, cuando los compuestos tienen un grupo amino, amido, hidroxilo, tio o carboxílico libres, se contempla que dichos grupos puedan emplearse para unir de manera covalente y liberable un resto que convierte el fármaco en un profármaco. Por tanto, los profármacos incluyen en particular aquellos en los que los compuestos contemplados forman un enlace éster, amida o disulfuro con otro resto escindible. Dichos restos pueden ayudar en la entrega específica de órgano o de célula del fármaco. Por ejemplo, un grupo carboxilo puede derivatizarse para formar un éster de amida o alquilo, que puede incluir un grupo éter, amina y/o ácido carboxílico. Los grupos hidroxilo libres pueden derivatizarse usando hemisuccinatos, ésteres de fosfato, dimetilaminoacetatos y fosforiloximetiloxycarbonilos, como se esboza en D. Fleisher, R. Bong, B. H. Stewart, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1996) 19, 115. También se incluyen profármacos de carbamato de grupos hidroxilo y amino, al igual que profármacos de carbonato y ésteres de sulfato de grupos hidroxilo. La derivatización de grupos hidroxilo como (aciloxi)metil y (aciloxi)etiléteres, en los que el grupo acilo puede ser un éster alquílico (opcionalmente sustituido) o cuando el grupo acilo es un éster de aminoácidos, también se contemplan (se describen profármacos de este tipo en R. P. Robinson y col., *J. Medicinal Chemistry* (1996) 39: p.10).

Aún más, también debe reconocerse que los compuestos contemplados pueden metabolizarse en una célula o compartimento extracelular y que dichos metabolitos pueden presentar el mismo o diferente efecto farmacológico. Por ejemplo, los compuestos contemplados pueden estar fosforilados y, por tanto, ser más activos que el compuesto parental. Por otro lado, la reducción o la glucosilación pueden afectar a la biodisponibilidad de los compuestos contemplados. En consecuencia, los compuestos contemplados no solo incluirán los descritos anteriormente, sino que también incluirán sus metabolitos.

Varios

Los diversos procedimientos y técnicas descritos anteriormente proporcionan un número de formas de realizar procedimientos relacionados con la materia objeto inventiva. Por supuesto, ha de entenderse que no necesariamente todos los objetivos o ventajas pueden conseguirse de acuerdo con cualquier realización particular descrita en el presente documento. Por tanto, por ejemplo, los expertos en la materia reconocerán que los procedimientos pueden realizarse de una manera que consiga u optimice una ventaja o grupo de ventajas como se enseña en el presente documento sin conseguir necesariamente otros objetivos o ventajas como puede enseñarse o sugerirse en el presente documento. Se menciona en el presente documento una diversidad de alternativas ventajosas y desventajosas. Ha de entenderse que algunas realizaciones preferidas incluyen específicamente una, otra o varias características ventajosas, mientras que otras excluyen específicamente una, otra o varias características desventajosas, mientras que otras mitigan específicamente una característica desventajosa actual mediante la inclusión de una, otra o varias características ventajosas.

Además, el experto en la materia reconocerá la aplicabilidad de diversas características de diferentes realizaciones. De forma similar, los diversos elementos, características y etapas analizados anteriormente, así como otros equivalentes conocidos para cada elemento, característica o etapa, pueden mezclarse y emparejarse por un experto habitual en esta materia para realizar procedimientos de acuerdo con los principios que se describen en el presente documento. Entre los diversos elementos, características y etapas, algunos se incluirán específicamente y otros se excluirán específicamente en diversas realizaciones.

En algunas realizaciones, los números que expresan cantidades de ingredientes, las propiedades tales como

concentración, condiciones de reacción, etc., utilizadas para describir y reivindicar determinadas realizaciones han de entenderse modificadas en algunos casos por el término "aproximadamente". En consecuencia, en algunas realizaciones, los parámetros numéricos establecidos en la descripción escrita y las reivindicaciones adjuntas son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se desean obtener mediante una realización particular. En algunas realizaciones, los parámetros numéricos deben interpretarse a la luz del número de dígitos significativos informados y mediante la aplicación de técnicas de redondeo habituales. A pesar de que los intervalos numéricos y los parámetros que establecen el ámbito amplio de algunas realizaciones son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se publican con la mayor precisión posible. Los valores numéricos presentados en algunas realizaciones pueden contener determinados errores resultantes necesariamente de la desviación típica encontrada en sus respectivas mediciones de ensayo.

Como se usa en la descripción en el presente documento y en todas las reivindicaciones a continuación, el significado de "un", "una", "el" y "la" incluye una referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en la descripción en el presente documento, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La mención de intervalos de valores en el presente documento solo pretende servir como procedimiento abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor individual se incorpora en la memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Todos los procedimientos que se describen en el presente documento pueden realizarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquiera y todos los ejemplos o el lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado con respecto a determinadas realizaciones en el presente documento pretende simplemente iluminar mejor la materia objeto inventiva y no plantea una limitación en el ámbito de las invenciones reivindicadas. Ningún lenguaje en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativo de ningún elemento no reivindicado esencial para la puesta en práctica de las invenciones reivindicadas.

Las agrupaciones de elementos o realizaciones alternativas de la materia objeto inventiva que se divulga en el presente documento no deben interpretarse como limitaciones. Puede hacerse referencia a o reivindicarse cada miembro del grupo individualmente o en cualquier combinación con otros miembros del grupo u otros elementos que se encuentren en el presente documento. Uno o más miembros de un grupo pueden incluirse o suprimirse de un grupo por razones de conveniencia y/o patentabilidad. Cuando se produce dicha inclusión o supresión, se considera en el presente documento que la memoria descriptiva contiene el grupo modificado satisfaciendo de este modo la descripción escrita de todos los grupos Markush utilizados en las reivindicaciones adjuntas.

Se desvelan en el presente documento realizaciones preferidas de la presente materia objeto inventiva, incluyendo el mejor modo conocido por los inventores para realizar las invenciones reivindicadas. Las variaciones en esas realizaciones preferidas serán evidentes para los expertos en la materia tras leer la descripción anterior. Se contempla que los artesanos expertos pueden emplear dichas variaciones según sea apropiado y las invenciones reivindicadas pueden ponerse en práctica de otra manera que la específicamente descrita en el presente documento. En consecuencia, las invenciones reivindicadas han de interpretarse como que incluyen todas las modificaciones y equivalentes de la materia objeto mencionada según lo permitido por la ley aplicable.

Ha de entenderse que las realizaciones que se desvelan en el presente documento son ilustrativas de los principios de la materia objeto inventiva. Por tanto, a modo de ejemplo, pero no de limitación, pueden usarse configuraciones alternativas de la materia objeto inventiva de acuerdo con el contenido del presente documento. En consecuencia, las realizaciones de la materia objeto inventiva no se limitan a eso precisamente como se muestra y se describe.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Los Regentes de la Universidad de California

<120> BLOQUEO DE PROTEASAS INFLAMATORIAS CON PÉPTIDOS CÍCLICOS

<130> 100843.0058US1

<150> US 61/492753

<151> 02-06-2011

<150> US 61/492.753

<151> 02-06-2011

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 500

ES 2 740 953 T3

	<212> ADN	
	<213> Macaca mulatta	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(500)	
	<223> precursor de theta defensina 1a (RTD1A), ARNm	
	<400> 1	
	gacggctgct gttgctacag gagacccagg acagaggact gctgtctgca ctctctcttc	60
	actctgccta acttgaggat ctgtcactcc agccatgagg accttcgccc tcctcaccgc	120
	catgcttctc ctgggtggccc tgcacgctca ggcagaggca cgtcaggcaa gagctgatga	180
	agctgccgcc cagcagcagc ctggaacaga tgatcaggga atggctcatt cctttacatg	240
	gcctgaaaac gccgctcttc cactttcaga gtcagcgaaa ggcttgaggt gcatttgcac	300
	acgaggattc tgccgtttgt tataatgtca ccttggggtcc tgcgcttttc gtggttgact	360
	ccaccggatc tgctgccgct gagcttccag aatcaagaaa aatatgctca gaagttactt	420
	tgagagttaa aagaaattct tgctactgct gtaccttctc ctcagtttcc ttttctcatc	480
	ccaaataaat accttatcgc	500
10	<210> 2	
	<211> 460	
	<212> ADN	
	<213> Macaca mulatta	
	<220>	
15	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(460)	
	<400> 2	
	gtctgccctc tctgctcgcc ctgcctaact tgaggatctg tcactccagc catgaggacc	60
	tttgccctcc tcactgccat gcttctcctg gtggccctgc acgctcaggc agaggcacgt	120
	caggcaagag ctgatgaagc tgccgccccag cagcagcctg gagcagacga tcagggaatg	180
	gctcattcct ttacacggcc tgaaaacgcc gctcttccgc tttcagagtc agcgagaggc	240
	ttgaggtgcc tttgcagacg aggagtttgc caactgttat aaaggcgttt ggggtcctgc	300
	gcttttcgtg gttgactctg ccggatctgc tgccgctgag cttccagaat caagaaaaat	360
	acgctcagaa gttactttga gagttgaaag aaattcctgt tactcctgta ccttgtcctc	420
	aatttccttt tctcatccca aataaatacc ttctcgcaag	460
20	<210> 3	
	<211> 421	
	<212> ADN	
	<213> Macaca mulatta	
	<220>	
25	<221> misc_feature	
	<222> (1)..(421)	
	<223> demidefensin 3 (LOC574121), ARNm	
	<400> 3	

ES 2 740 953 T3

	gtgaccccag ccatgaggac cctcgccctc cacactgcca tgctttctct ggtggccctg	60
	cacgctcagg cagaggcacg tcaggcaaga gctgatgaag ctgccgcca gcagcagcct	120
	ggagcagatg atcagggaaat ggctcactcc tttacatggc ctgaaaacgc cgctcttccg	180
	ctttcagagt cagagagagg cttgaggtgc atttgcgtac taggaatttg ccgtctgtta	240
	taacggcatt tgcggtcctg cgacttttgt ggttgactct atcggatctg ttgccgctga	300
	gcttgacagaa tcaagaaaaa caagctcaga agttactttg agagttaaaa gaaattcttg	360
	ttactcctct accttgccct aaatttcctt ttctcatccc aaataaatac cttctcgcaa	420
	g	421
5	<210> 4 <211> 514 <212> ADN <213> Papio anubis	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(514) <223> precursor de theta defensina a (BTD-a) ARNm, cds completo	
10	<400> 4	
	agacctggga cagaggactg ctgtctgcac tctctcttca ctctgcctaa cttgacgatc	60
	tgtcactcca gccatgagga ccttcgccct cctcaccgcc atgctttctcc tgggtggccct	120
	gcatgctcag gcagaggcac gtcaggcaag agctgatgaa gctgctgccc agcagcagcc	180
	tggagcagat gatcagggaa tggctcattc ctttacatgg cctgaaaacg ccgctcttcc	240
	gctttcagag tcagcgaaag gcttgaggtg cgtttgcaca cgaggattct gccgtttgtt	300
	ataatgtcac cttgggtcct gcgcctttca tggttgactc caccggatct gctgccgctg	360
	agcttccaga atcaagaaaa atacgctcag aagttacttt gagagttaca agaaattctt	420
	gctactgctg taccttctcc tcagtttcct tttctcatcc caaataaata ccttatcgca	480
	agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	514
15	<210> 5 <211> 504 <212> ADN <213> Papio Anubis	
	<220> <221 > misc_feature <222> (1)..(504) <223> theta defensina b (BTDB), ARNm	
20	<400> 5	

ES 2 740 953 T3

	agacccggga cagaggactg ctgtctgccc tctctcttca ctctgcctaa cttgaggatc	60
	tgtcactcca gccatgagga cctttgccct cctcaccgcc atgcttctcc tggtaggcct	120
	gcagcctcag gcagaggcac gtcaggcaag agctgatgaa gctgccgccc agcagcagcc	180
	tggagcagat gatcagggaa tggctcattc ctttacacgg cctgaaaacg ccgctcttcc	240
	actttcagag tcagcgaaag gcttgaggtg cgtttgcaga cgaggagttt gccaaactgtt	300
	ataaaggcgt ttggggctct gcgcttttcg tggttgactc tgtcagatct gctgccgctg	360
	agcttccaga atcaagaaaa atacgctcag aagttacttt gagagttgaa agaaattctt	420
	gttactcctg taccttgtcc tcaatttcct tttctcatcc caaataaata ccttctcgca	480
	aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaa	504
5	<210> 6 <211> 542 <212> ADN <213> Papio anubis	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(542) <223> theta defensina c (BTDC), ARNm	
10	<400> 6	
	agacccggga cagaggactg ctgtctgccc tctctggtca ctctgcgtag cacaaggatc	60
	tgtcactcca gccatgagga ccttcgcctt cctcactgcc atgcttctcc tggtaggcct	120
	gcacgcacag gcagaggcac gtcaggcaag agctgatgaa gctgccatcc aggagcagcc	180
	tggagcagat gatcagggaa tggctcattc ctttacacgg aatgaaagtg ccgttcttcc	240
	gctttcagag tcagagagag gcttgaggtg catttgctta ctaggaattt gccgtctgtt	300
	ataacggcgt ttgcggctct gcgactttcg tggttgactc tatcggatct gttgccactg	360
	agcttgcaga atcaagaaaa accagctcag aagttacttt gagagttaaa agaaattctt	420
	gttactcctc taccttgccc tcaatttcct tttctcatcc caaataaata ccttgtcgca	480
	agaaaaaaaa agaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	540
	aa	542
15	<210> 7 <211> 258 <212> ADN <213> Papio anubis	
	<220> <221> misc_feature <222> (1)..(258) <223> theta defensina d (LOC100196942), ARNm	
20	<400> 7	

ES 2 740 953 T3

actccagcca tgaggacctt tgccctcctc accgccatgc ttctcctggt ggcctgcag	60
gctcaggcag aggcacgtca ggcaagagct gatgaagctg ccgccagca gcagcctgga	120
gcagatgatc agggaatggc tcattccttt acacggcctg aaaacgccgc tcttcctctt	180
tcagagtcag cgaaaggctt gaggtgcttt tgcagacgag gagtttgcca actgttataa	240
aggcgcttgg ggtcctgc	258

REIVINDICACIONES

1. Una θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria crónica en un animal.
- 5 2. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el análogo de θ -defensina comprende al menos uno del grupo que consiste en RTD-1-27, RTD-1-28 y RTD-1-29.
3. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la θ -defensina es eficaz para producir una inhibición clínicamente pertinente de una proteasa proinflamatoria.
- 10 4. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la θ -defensina es eficaz para producir una inhibición clínicamente pertinente de una proteasa proinflamatoria de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la proteasa proinflamatoria se selecciona entre la enzima convertidora del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (TACE), o una sheddasa.
- 5 5. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la afección inflamatoria crónica comprende una enfermedad autoinmunitaria.
- 15 6. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que la enfermedad autoinmunitaria es una enfermedad inflamatoria intestinal.
7. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la enfermedad inflamatoria intestinal es colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn.
8. La θ -defensina, o análogo de la misma, para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la afección inflamatoria crónica comprende artritis reumatoide.

20

FIG. 1

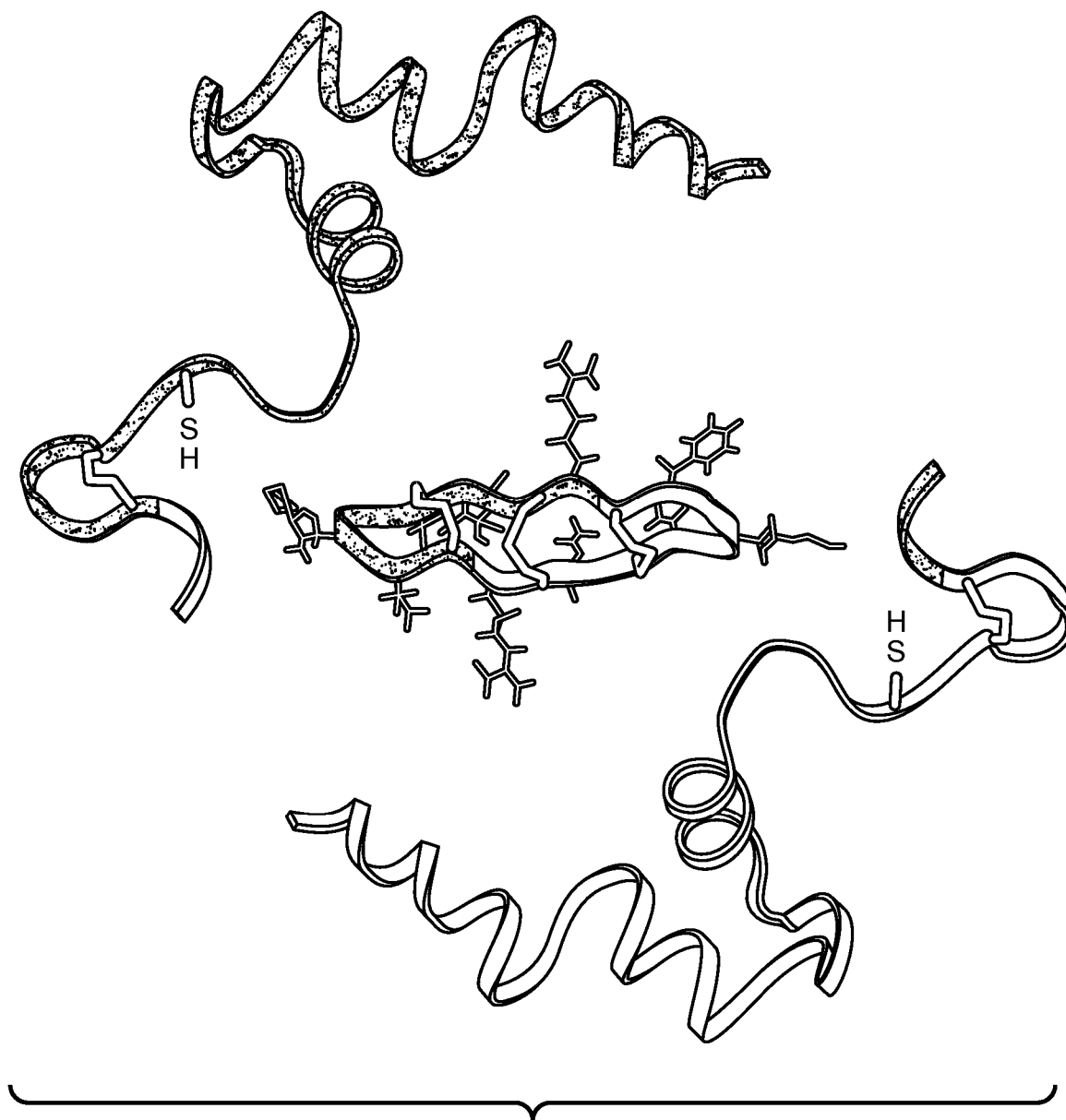
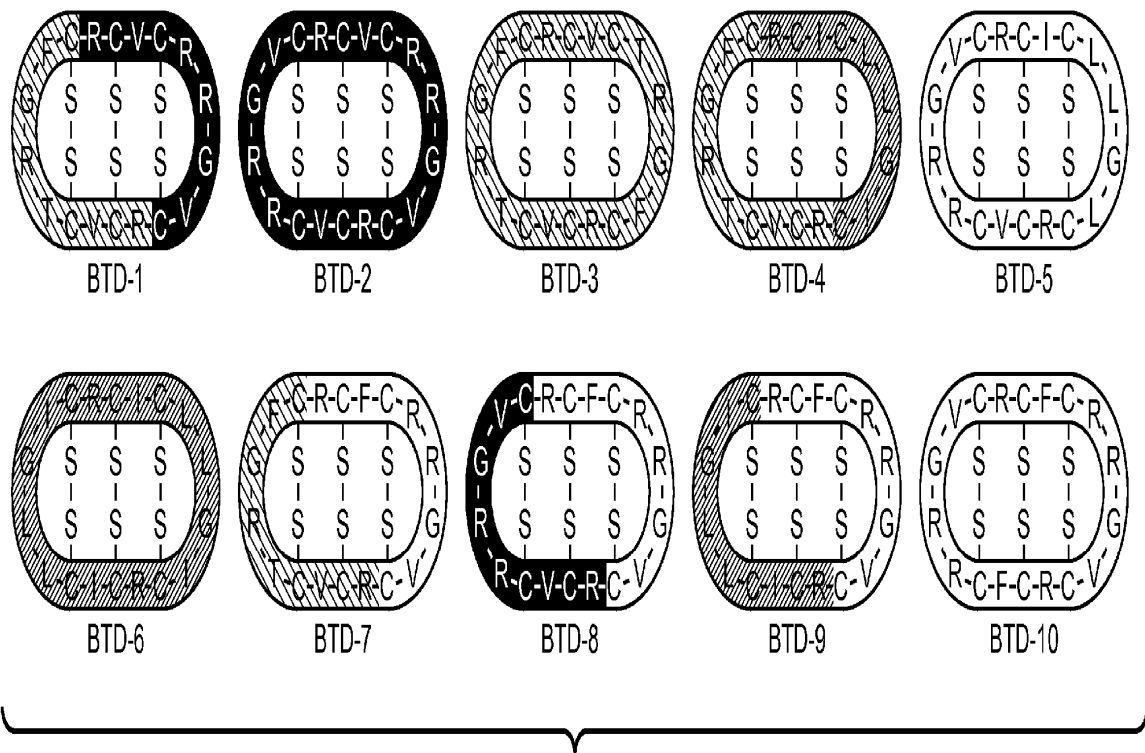
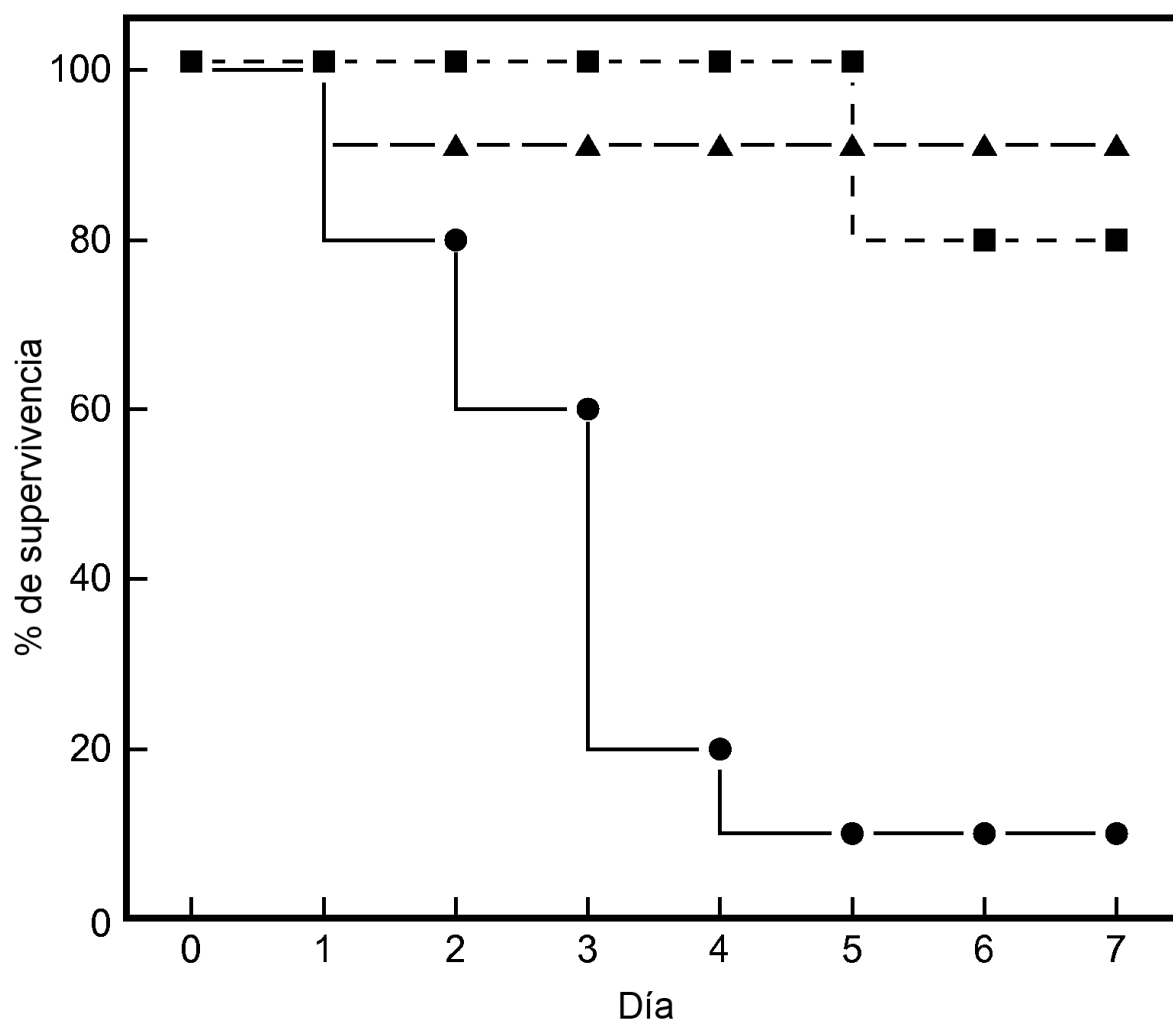


FIG. 2

A	Señal	Prosegmento	Nonúmero
	1	21	65
BTD-a	MRTFALLTAMLLLVALHAQA	EARQARADEAAAQQPGADDQGMHSFTWPENAAALPLSESAGL	RCVCTRGFCRL*R..V.Q...
BTD-b	QP..	R.....	I..I..I.....
BTD-c	F.....	I.E.....RN.S.I.....ER..	F.R..V.Q...
BTD-d	Q..	R.....	I.....
RTD1a		T.....	L.R..V.Q...
RTD1b		R.....R..	I.VL.I.....
RTD1c	...L..H.....	R.....	I.G..I.....
HTDp	#...	.PL.....E.....E..A..H.S.....D..R..	

B



*FIG. 3*

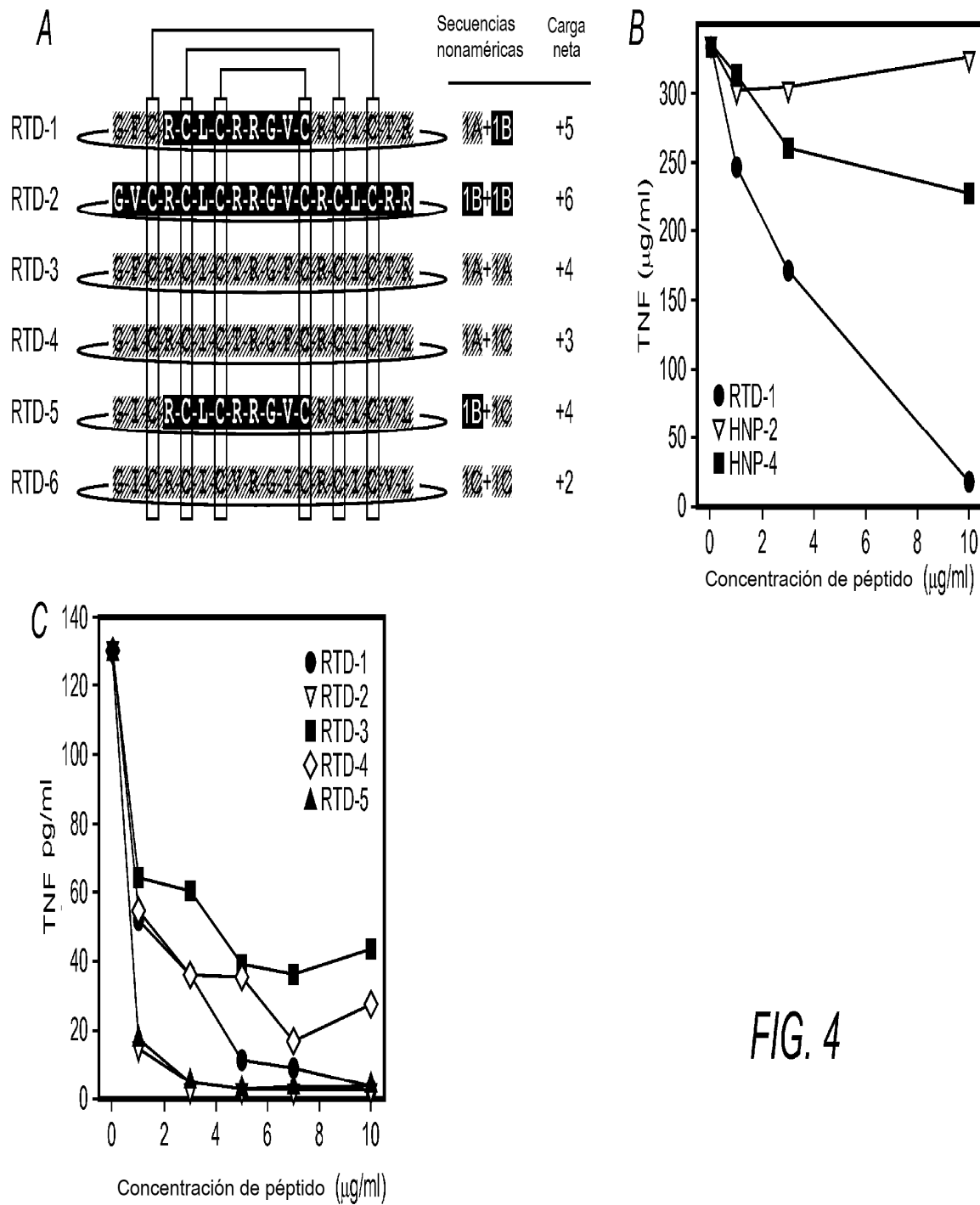


FIG. 4

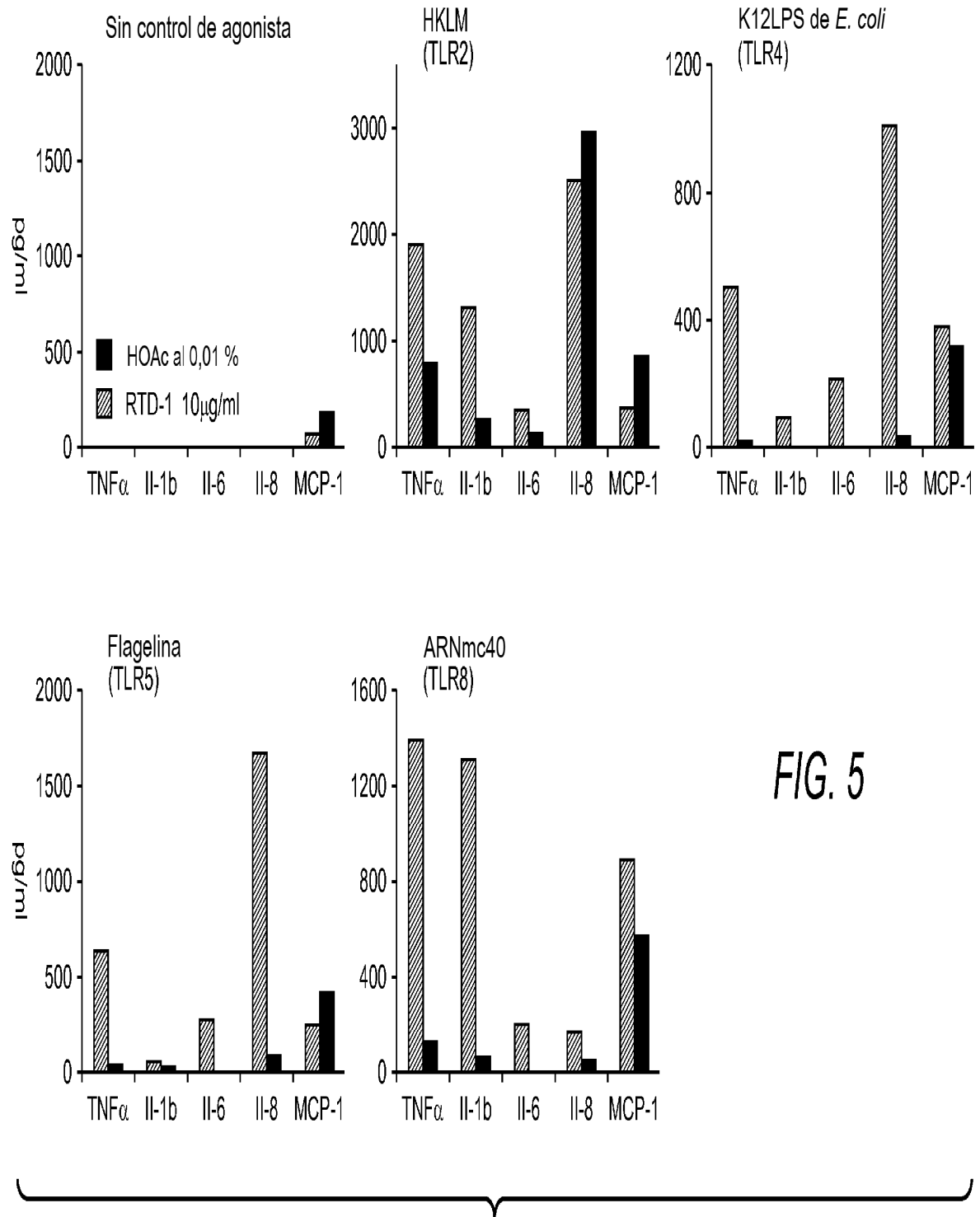
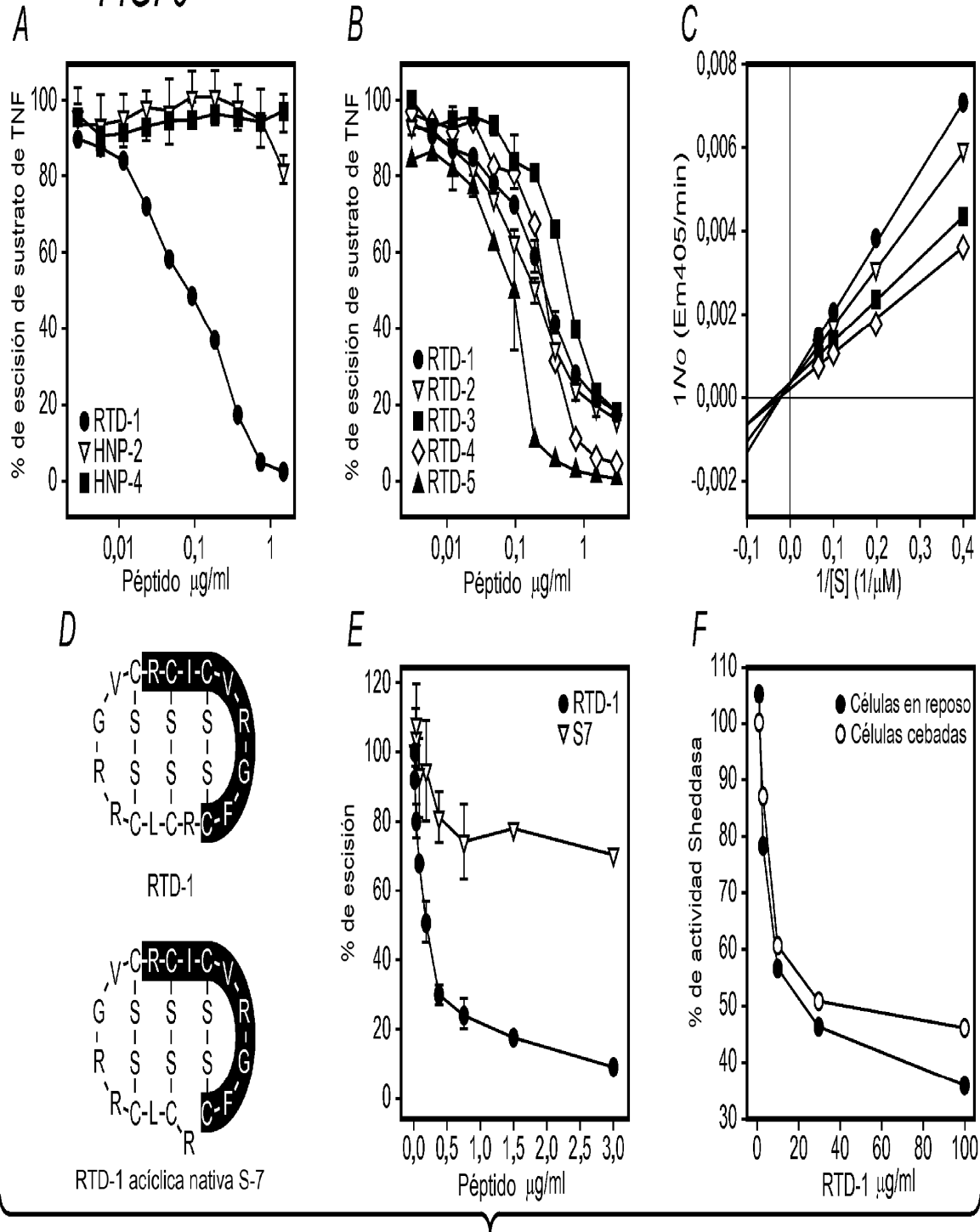


FIG. 5

FIG. 6



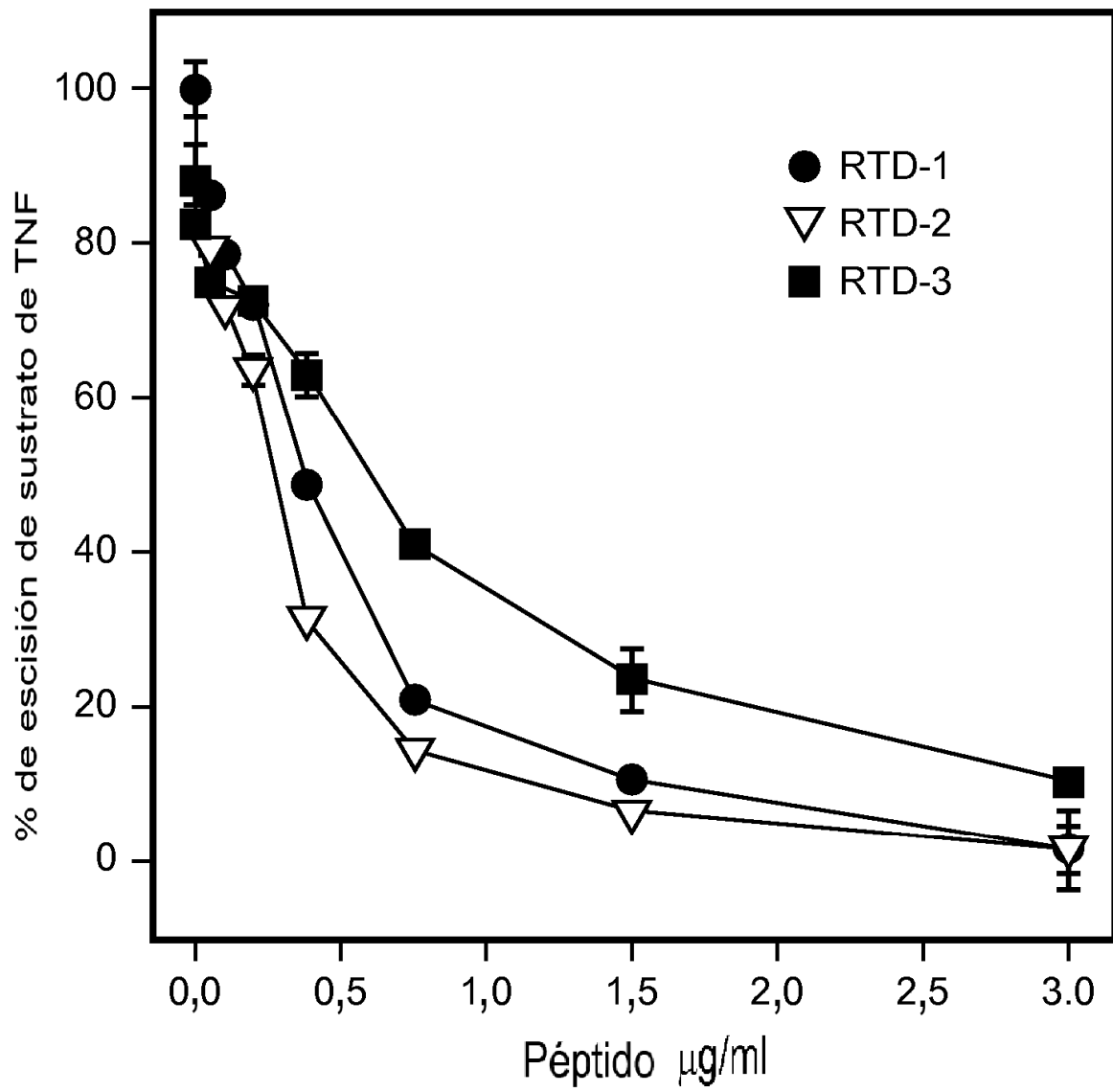
*FIG. 7*

FIG. 8

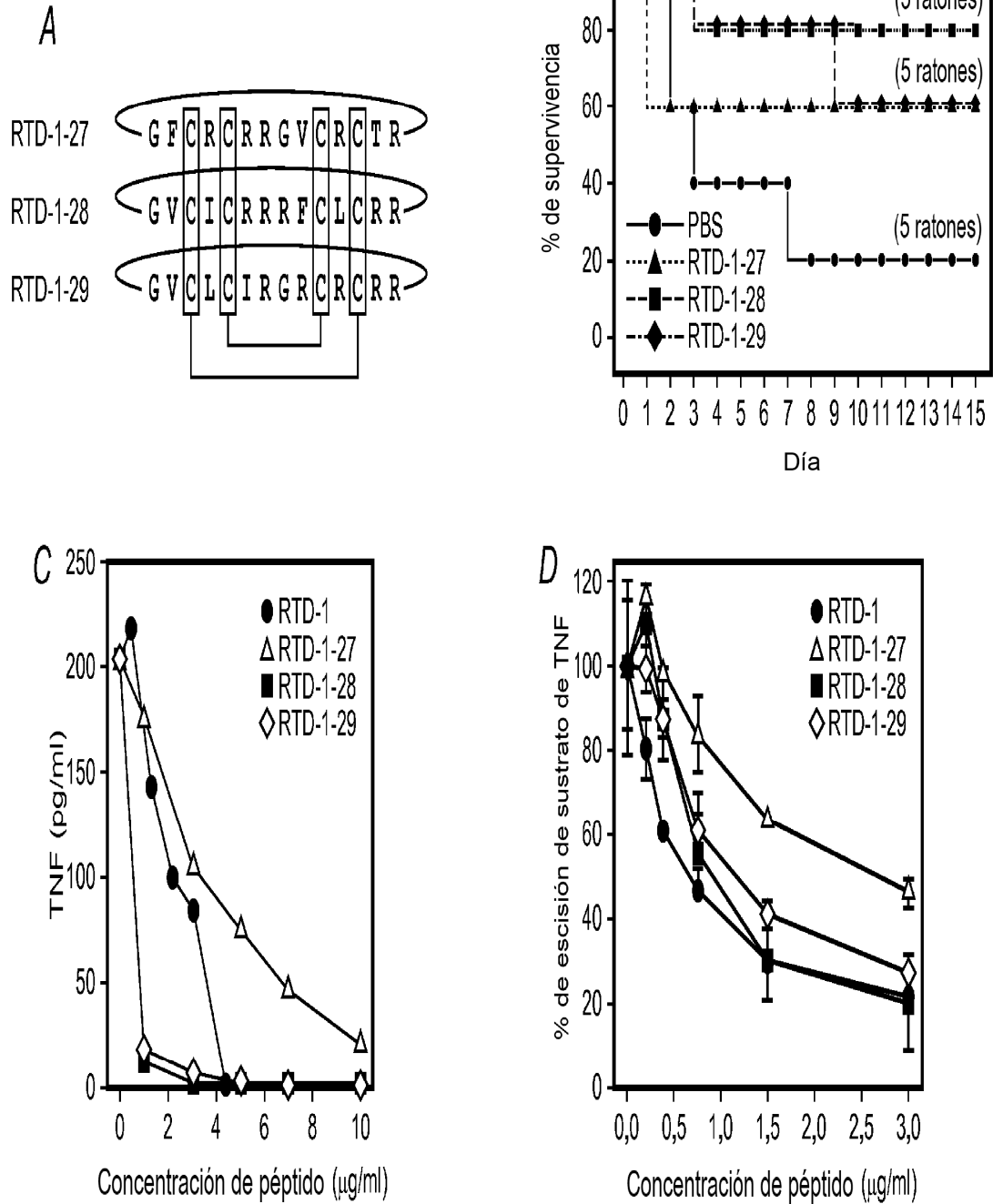


FIG. 9

