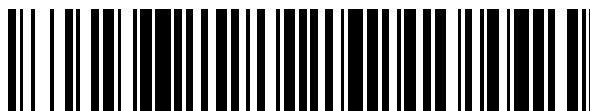


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 003**

51 Int. Cl.:

C07K 14/435

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.05.2013 E 17208839 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2019 EP 3333180**

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
15.03.2013 WO PCT/EP2013/055329**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
24.03.2020

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 2 750 003 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

- 5 La presente invención se refiere al uso de un péptido antiinflamatorio y composiciones que comprenden el mismo en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

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 Puede utilizarse la ruta de la ciclooxigenasa (COX) o la ruta de la lipooxigenasa (LOX) para la señalización de la inflamación, que produce prostaglandina, tromboxano, etc. Una vez que se produce 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 anómala de
- 15 defensa biológica excesiva. Para evitar esto, están en desarrollo fármacos que suprimen la respuesta 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
- 20 específica, algunas semanas o más), inflamación subaguda (una etapa intermedia entre la inflamación aguda y la inflamación crónica, características de los productos mixtos de mononucleares y polimorfonucleares).

- También, además de los factores peptídicos, pueden producir la inflamación factores tales como prostaglandinas, leucotrieno, 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
- 25 inmunitario y factores de coagulación.

- Una vez que una célula está dañada debido a agentes causantes de la inflamación conocidos 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, dolor y generación de calor.
- 30

- Los tratamientos usados actualmente para la inflamación son fármacos sintéticos tales como ibuprofeno, antihistamínicos, esteroides, cortisona, agentes inmunosupresores, y agonistas inmunitarios; aquellos que solamente alivian temporalmente la inflamación. Estos fármacos no curan fundamentalmente la inflamación y tienen efectos secundarios tales como reacción de hipersensibilidad, y deterioro del sistema inmunitario.
- 35

- Por lo tanto, para un alivio eficaz de la inflamación, se lleva 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 estos fármacos no solo tienen con frecuencia efectos secundarios tras su uso, tampoco curan fundamentalmente la inflamación. En consecuencia, existe una necesidad actual de fármacos antiinflamatorio que sean factibles tanto física como 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.
- 40
- 45

El documento US 2007/190561 A1 describe que la actividad de la telomerasa y la longitud de los telómeros pueden aumentarse, por ejemplo, aumentando los niveles de productos (proteína y ARNm) del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana (hTERT) en la célula, y que las afecciones asociadas con la senescencia celular en las que la expresión de hTERT puede ser terapéutica incluyen la enfermedad de Alzheimer.

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

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga actividad antiinflamatoria para su uso como principio activo.

Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que utilice este péptido como un

principio activo.

Sumario de la invención

En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido con actividad antiinflamatoria, en la que el péptido comprende

- 5 (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o
(b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, o
(c) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a) o (b)

para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

En otra realización, el péptido para dicho uso consiste en, como máximo, 30 aminoácidos.

- 10 En otra realización, el péptido para dicho uso consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 o 26 restos de aminoácidos.

En otra realización, el péptido para dicho uso consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

Por ejemplo, el péptido puede consistir en 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9 u 8 restos de aminoácidos.

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

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones anteriores como principio activo para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

Aplicabilidad industrial

- 20 De acuerdo con la presente invención, un péptido que tiene una secuencia de la SEQ ID NO: 1 tiene una excelente eficacia tanto en la supresión de la inflamación como en los medios profilácticos. Por lo tanto, la composición que comprende el péptido se puede usar como composición farmacéutica antiinflamatoria para tratar y prevenir la enfermedad de Alzheimer.

REFERENCIA

- 25 KR2012-0130996A
KR2012-0133661A
KR2011-0060940A
US2011-0150873A1
Bonaldi T y col., EMBO J, (22)5551-60, 2003
30 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

- 35 La figura 1 es una gráfica que muestra los resultados de llevar a cabo un ELISA para 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 FITC-péptido durante dos horas. (** P < 0,01. En comparación con el control negativo (FITC y FITC-TAT).

- 40 La figura 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-kB, reaccionando a continuación con lipoproteína (10 ng/ml) y FITC y FITC-PEP-1(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.)

La FIG. 3 representa los niveles de inhibición de citocinas en la línea celular THP1 que se trataron con ninguno, LPS, PEP 1 y LPS + PEP 1.

- 45 La FIG. 4 representa la viabilidad de células madre neuronales tratadas con 0, 2,5, 5,0, 10, 20 y 40 μ M de proteína β -amiloide.

La FIG. 5 representa la proliferación de células madre neuronales tratadas con 0, 2,5, 5,0, 10, 20 y 40 μM de proteína β -amiloide.

La FIG. 6 representa la viabilidad de células madre neuronales tratadas con 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μM de PEP 1.

La FIG. 7 representa la proliferación de células madre neuronales tratadas con 0, 1, 10, 50, 100 y 200 μM de PEP 1.

La FIG. 8 representa la viabilidad de células madre neuronales tratadas con 1, 10, 50 y 100 μM de PEP 1; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación, se midió la viabilidad celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1. (Los grupos control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

La FIG. 9 representa la toxicidad de las células madre neuronales tratadas con 1, 10, 50 y 100 μM de PEP 1; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación, se midió la toxicidad celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1. (Los grupos control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

La FIG. 10 representa la proliferación de células madre neuronales tratadas con 1, 10, 50 y 100 μM de PEP 1; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación, se midió la proliferación celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1. (Los grupos control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

La FIG. 11 representa la migración de las células madre neuronales tratadas con 1, 10, 50 y 100 μM de PEP 1; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación, se midió la migración celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1. (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP-1).

La FIG. 12 representa la apoptosis de las células madre neuronales tratadas con 1, 10, 50 y 100 μM de PEP 1; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación, se midió la apoptosis celular después del tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1. (Los grupos control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y péptidos basados en telomerasa).

La FIG. 13 representa el efecto inhibidor de ROS (Especies Reactivas de Oxígeno) de PEP-1 en células madre neuronales dañadas por el péptido beta amiloide; las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación se midió la inhibición de ROS tras el tratamiento con diferentes concentraciones de PEP-1 (1, 10, 50 y 100 μM). (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP-1).

La FIG. 14 representa los resultados de los niveles de expresión de la proteína analizados mediante (A) electroforesis 2D y (B) Matriz de anticuerpos; las células madre neuronales fueron dañadas 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 PEP-1 (1, 10 y 50 μM). (Los grupos del control fueron aquellos no tratados con proteína beta amiloide y PEP-1).

La FIG. 15 representa los resultados de transferencia western que muestran el nivel de expresión de las proteínas relacionadas con la inflamación: las células madre neuronales fueron dañadas por 20 μM de proteína beta amiloide, y a continuación se trataron con diferentes concentraciones de PEP-1 (1, 10 y 50 μM).

La FIG. 16 representa el efecto inhibidor 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 proteína beta amiloide 1 μM y PEP 1 (0,1, 1 y 10 μM). (B) muestra el caso cuando PEP-1 se trató sobre la proteína β -amiloide que ya se indujo para la agregación.

La FIG. 17 representa el efecto del inhibidor de PI3K, LY294002 sobre la viabilidad de las células tratadas con PEP 1. El aumento de la viabilidad celular tras tratar con PEP 1 disminuyó cuando se trató con LY294002.

Descripción detallada de la invención

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 otro lado, 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

comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el péptido tiene una homología superior al 80% con la secuencia mencionada anteriormente, o el péptido es un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente.

- 5 El péptido con actividad antiinflamatoria en la presente invención es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos para la SEQ ID NO: 1. El péptido de la SEQ ID NO: 1 es un péptido que consiste en 16 aminoácidos en la ubicación de la telomerasa- [611-626].

SEQ ID NO: 1 EARPALLTSRLRFIPK

- 10 En una realización de la presente divulgación, se proporciona un polinucleótido que codifica un péptido con actividades antiinflamatorias. El polinucleótido codifica un péptido comprende al menos una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene una homología superior al 80% con la secuencia mencionada anteriormente, o un péptido que es un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente. El polinucleótido mencionado anteriormente permite la producción de los péptidos en grandes cantidades. Por ejemplo, el cultivo de vectores que incluyen polinucleótidos que codifican péptidos permite la producción de péptidos en grandes cantidades.

- 15 Los péptidos desvelados en el presente documento pueden incluir un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80%, superior al 85 %, superior al 90 %, superior al 95 %, superior al 96 %, superior al 97 %, superior al 98 %, o superior al 99 % de homología. Además, los péptidos desvelados en la presente invención pueden incluir un péptido que comprende la SEQ ID NO: 1 o sus fragmentos, y un péptido con más de 1 aminoácido transformado, más de 2 aminoácidos transformados, más de 3 aminoácidos transformados, más de 4 aminoácidos transformados, más de 5 aminoácidos transformados, más de 6 aminoácidos transformados o más de 7 aminoácidos transformados.

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

- 25 A menos que se indique lo contrario, la expresión "identidad de secuencia" para péptidos, 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 manera que un número máximo de aminoácidos son idénticos y en la que n_{ref} es el número de restos en la secuencia más corta. Por lo tanto, la secuencia de ADN agtcagtc tendrá una identidad de secuencia del 75% con la secuencia aatcaatc ($n_{dif}=2$ y $n_{ref}=8$).

- 30 En algunas realizaciones, la identidad de secuencia se determina por procedimientos convencionales, por ejemplo, Smith y Waterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2:482, mediante la búsqueda para el 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 implementaciones informatizadas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group). También se puede utilizar el algoritmo BLAST (Altschul y col., 1990, Mol. Biol. 215:403-10) para el cual se puede obtener el software a través del Centro Nacional de Información Biotecnológica (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Cuando se utiliza cualquiera de los algoritmos mencionados anteriormente, se utilizan los parámetros predeterminados para la longitud de "Ventana", la penalización por hueco, etc.

- 40 En una realización de la presente invención, los cambios en la secuencia de aminoácidos pertenecen a la modificación de las características físicas y químicas de los péptidos. Por ejemplo, la transformación de aminoácidos se puede realizar mejorando la estabilidad térmica del péptido, alterando la especificidad de sustrato y cambiando el pH óptimo.

En una realización de la presente invención, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente o un fragmento de péptido de los péptidos mencionados anteriormente está hecho preferentemente de 30 o menos aminoácidos.

- 45 En una realización de la presente invención, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente o un fragmento de péptido de los péptidos mencionados anteriormente comprende un péptido originado a partir de telomerasa, más específicamente, telomerasa de *Homo sapiens*.

- 50 El término "aminoácido" en el presente documento incluye no solo los 22 aminoácidos naturales que se integran naturalmente en el péptido sino también los isómeros D y los aminoácidos transformados. Por lo tanto, en una realización específica de la presente invención, un péptido en el presente documento incluye un péptido que tiene D-aminoácidos. Por otro lado, un péptido puede incluir aminoácidos no naturales como los que se han modificado postraduccionalmente. Ejemplos de modificación postraducciona incluyen fosforilación, glucosilación, acilación (incluyendo acetilación, miristilación, palmitoilación), alquilación, carboxilación, hidroxilación, glicación, biotilación, ubiquitinilación, transformación en propiedades químicas (por ejemplo, eliminación de β , deimidación, desamidación) y transformación estructural (por ejemplo, formación de puente disulfuro). También, se incluyen cambios de aminoácidos y los cambios de aminoácidos se producen debido a una reacción química durante el procedimiento de

combinación con reticuladores para la formación de un péptido conjugado.

Un péptido desvelado en el presente documento puede ser un péptido de tipo silvestre que se ha identificado y aislado de fuentes naturales. Por otro lado, en comparación con los fragmentos de péptidos de la SEQ ID NO: 1, los péptidos desvelados en el presente documento pueden ser mutantes artificiales que comprenden uno o más aminoácidos sustituidos, delecionados y/o insertados. La alteración de aminoácidos en el polipéptido de tipo silvestre, no solo en mutantes artificiales, comprende sustitución conservativa de aminoácidos que no influyen en el plegamiento o activación de la proteína. Ejemplos de sustitución conservativa pertenecen al grupo que consiste en aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Las sustituciones de aminoácidos que generalmente no alteran la actividad específica son conocidas en la técnica de la presente invención. Las alteraciones más comunes producidas 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. Otro ejemplo de sustituciones conservadoras se muestra en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

Aminoácido original	Ejemplos de sustitución de restos	Sustitución de resto preferente
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; hls; 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; gin; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
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 biológicas de los péptidos se realiza seleccionando una sustitución significativamente diferente en las siguientes eficacias: (a) la eficacia en el mantenimiento de la estructura del esqueleto del polipéptido en el área de sustitución, tal como estructuras tridimensionales en lámina o helicoidales, (b) la eficacia en el mantenimiento de la carga eléctrica o la hidrofobicidad de la molécula en el área diana o (c) la eficacia en el mantenimiento de la mayor parte de la cadena lateral. Los restos naturales se dividen en grupos por las propiedades generales de la cadena lateral 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) restos que afectan a la orientación de la cadena: gly, pro; y

(6) aromaticidad: trp, tyr, phe.

5 Las sustituciones no conservativas se pueden realizar intercambiando un miembro de las clases anteriores por una clase diferente. Cualquier resto de cisteína que no esté relacionado con el mantenimiento de la estructura tridimensional adecuada del péptido generalmente puede sustituirse por serina, aumentando así la estabilidad oxidativa de la molécula y evitando la reticulación inadecuada. Por el contrario, se puede lograr una mejora de la estabilidad añadiendo enlaces de cisteína al péptido.

10 Los tipos alterados de variantes de aminoácidos de los péptidos son aquellos que cambiaron el patrón de glucosilación de anticuerpos. El término "cambio" en el presente documento se refiere a la delección de restos de carbohidratos y/o la adición de al menos un resto glicosilado que no existe dentro de un péptido.

15 La glucosilación en péptidos está generalmente N-conectada u O-conectada. El término "N-conectado" en el presente documento se refiere a que los restos de carbohidratos están unidos a la cadena lateral de los restos de asparagina. Como secuencias de tripéptidos, la asparagina-X-serina y la asparagina-X-treonina (en las que la X es cualquier aminoácido excepto prolina) son la secuencia de reconocimiento para unir enzimáticamente el resto de carbohidrato a la cadena lateral de la asparagina. Por lo tanto, con la presencia de una de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido, se crean los posibles sitios de glucosilación. La "glucosilación O-conectada" significa unir uno de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa a los aminoácidos con hidroxilo. Los aminoácidos con hidroxilo son más generalmente serina o treonina, pero se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

20 La adición del sitio de glicosilación a un péptido se realiza convenientemente cambiando la secuencia de aminoácidos para contener la secuencia de tripéptidos mencionada anteriormente (para sitios de glicosilación unidos a N). Estos cambios pueden realizarse mediante la adición de al menos un resto de serina o treonina a la primera secuencia de anticuerpo, o mediante sustitución con esos restos (para sitios de glicosilación unidos a O).

25 En una realización de la presente divulgación, un polinucleótido es una molécula de ácido nucleico que puede ser una molécula de ADN o ARN espontánea o artificial, ya sea monocatenaria o bicatenaria. La molécula de ácido nucleico puede ser uno o más ácidos nucleicos del mismo tipo (por ejemplo, que tienen una misma secuencia de nucleótidos) o ácidos nucleicos de diferentes tipos. Las moléculas de ácido nucleico comprenden uno o más ADN, ADNc, ADN señuelo, ARN, ARNip, miARN, ARNhc, ARNtp, ARNnop, ARNnp, APN, oligómero antisentido, plásmido y otros ácidos nucleicos modificados, pero sin limitación a esos.

30 Una proteína HMGB1 se conoce como una citocina. Primero se somete a acetilación y translocación al citoplasma por estimulación externa. A continuación, se secreta fuera de la célula, por lo tanto, cumple el papel de citocina que causa inflamación. Porque cuando uno tiene una inflamación debido a dicha actividad, la proteína HMGB1 se secreta fuera de la célula, y los pacientes con enfermedades inflamatorias como el síndrome de Churg strauss, la artritis reumatoide y el síndrome de Sjogren presentarán niveles en suero elevados de HMGB1. Por lo tanto, si el núcleo contiene una gran cantidad de HMGB1, incluso cuando hay un estímulo que causa inflamación, esto sugiere el hecho de que HMGB1 no se secreta fuera de la célula, lo que significa que se está suprimiendo la inflamación.

35 En una realización de la presente invención, cuando se trata una célula con un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene más del 80% de homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente, la cantidad de HMGB1 dentro del núcleo aumenta. Esto representa que los péptidos mencionados anteriormente tienen excelentes efectos preventivos o supresores de la inflamación.

40 También, en realizaciones específicas de la presente invención, un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, un péptido que tiene más del 80% de homología de la secuencia de aminoácidos con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente, tiene la ventaja de que tiene una alta fiabilidad debido a su baja toxicidad dentro de una célula.

45 En la presente divulgación, una "enfermedad inflamatoria" es una indicación amplia que se refiere a cualquier enfermedad que designa la inflamación como causa principal o inflamación causada por la enfermedad. De manera específica, una enfermedad inflamatoria incluye (1) 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; neumonitis intersticial; EPOC (enfermedad pulmonar

obstruktiva crónica); síndrome de dificultad respiratoria en el adulto; coniosis; alveolitis; bronquiolitis; faringitis; pleuresía; o sinusitis); (6) enfermedades relacionadas con los huesos, articulaciones, músculos y tejido conectivo (por ejemplo, granuloma eosinófilo; artritis; artralgia; 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; oncocercosis; o amebiasis); (10) enfermedad autoinmunitaria (por ejemplo, tiroiditis; lupus; síndrome de Goodpasture; rechazo de aloinjerto; enfermedad del injerto contra el huésped; o diabetes); y (11) cáncer o enfermedad tumoral (por ejemplo, enfermedad de Hodgkin), pero sin limitación a esos.

El tratamiento del componente inflamatorio de tales enfermedades ha sido un objetivo principal de la industria farmacéutica mundial durante varias décadas, y se ha desarrollado una amplia variedad de tratamientos útiles. Los ejemplos incluyen los corticosteroides (una gama de agentes naturales, semisintéticos y sintéticos diseñados para imitar el efecto del cortisol, que incluyen prednisolona, metilprednisolona, dexametasona, betametasona, fluticasona y similares), inhibidores de la ciclooxigenasa (tanto no selectivos como selectivos de cox-1, tal como indometacina, sulfasalzina y aspirina, y más recientemente selectivos de cox-2, tal como celecoxib), bloqueadores de leucotrienos (tal como montelukast) y anti-TNF (tal como anticuerpos neutralizantes monoclonales modificados), incluidos infliximab (Remicade™) y adalimumab (Humira™), proteínas de fusión del receptor de TNF, tal como etanercept (Enbrel™), así como inhibidores de síntesis de TNF- α de molécula pequeña como la talidomida).

En una realización de la presente invención, se proporciona una composición antiinflamatoria para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer, que comprende un péptido como principio activo. El péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el péptido tiene una homología superior al 80% con la secuencia mencionada anteriormente, o el péptido es un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente.

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 que comprende la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento peptídico de los péptidos mencionados anteriormente. Cuando el péptido está contenido en el intervalo mencionado anteriormente, toda la seguridad y estabilidad de la composición puede satisfacerse y ser apropiada en términos de rentabilidad.

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

En una realización de la presente invención, se proporciona la composición farmacéutica para el uso de tratamiento o profilaxis de la enfermedad de Alzheimer con un principio activo que está compuesto por un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos por encima del 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente o fragmento de péptido de la SEQ ID NO: 1. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se puede administrar por vía oral, rectal, transdérmica, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, en la médula ósea, epidural o subcutánea.

Formas de administración oral pueden ser, pero sin limitación, comprimidos, píldoras, cápsulas blandas o duras, gránulos, polvos, solución o emulsión. Formas de administración no oral pueden ser, pero sin limitación, inyecciones, goteo, lociones, pomadas, geles, cremas, suspensiones, emulsiones, supositorio, parche o pulverización.

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, agentes aromáticos o edulcorantes. En una realización de la presente invención, la composición farmacéutica se puede fabricar por procedimientos convencionales de la industria en la técnica.

En una realización de la presente invención, el principio activo de la composición farmacéutica puede variar de acuerdo con la edad, sexo, peso, patología y estado del paciente, la vía de administración o el criterio del médico. La dosis basándose en estos factores se determina dentro de los niveles de los expertos en la materia, y la dosis diaria, por ejemplo, puede ser, pero sin limitación, de 0,1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 1 $\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, específicamente de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 10 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ a 1 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$, más específicamente de 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 se puede administrar, pero sin limitación, de 1 a 3 veces al día.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona una composición externa para la piel para mejorar o prevenir la inflamación de la piel. La composición externa para la piel puede contener un principio activo que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento de péptido

de péptidos mencionados anteriormente.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona una composición cosmética para mejorar o prevenir la inflamación de la piel. La composición cosmética puede contener un principio activo que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento peptídico de los péptidos mencionados anteriormente.

En una realización de la presente divulgación, la composición de aplicación externa o la composición cosmética se pueden proporcionar en todas las formas apropiadas para aplicaciones tópicas. Por ejemplo, las formas pueden proporcionarse como soluciones, emulsiones obtenidas por dispersión de fase oleosa en agua, emulsión obtenida por dispersión de agua en fase oleosa, suspensión, sólida, gel, polvo, pasta, espuma o aerosol. Estas formas se pueden fabricar por procedimientos convencionales de la industria en la técnica.

En una realización de la presente divulgación, la composición cosmética puede incluir, dentro de niveles que no perjudiquen el efecto principal, otros ingredientes que pueden aumentar deseablemente el efecto principal. En una realización de la presente divulgación, la composición cosmética puede incluir adicionalmente humectantes, agentes emolientes, tensioactivos, absorbentes de UV, conservantes, fungicidas, antioxidantes, agentes de ajuste de pH, pigmentos orgánicos o inorgánicos, agentes aromáticos, agentes refrigerantes o antitranspirantes. Los expertos en la materia pueden decidir la proporción de formulación de los ingredientes mencionados anteriormente dentro de niveles que no perjudiquen el fin y los efectos de la presente invención, y la proporción de formulación basándose en el peso total de la composición cosmética puede ser del 0,01 al 5% en peso, específicamente del 0,01 al 3% en peso.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona una composición alimenticia para la prevención o supresión de la inflamación. La composición alimenticia puede contener un principio activo que es un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos superior al 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento peptídico de los péptidos mencionados anteriormente.

En una realización de la presente divulgación, la composición alimenticia no se limita a las formas, sino que, por ejemplo, pueden ser gránulos, polvo, líquido y formas sólidas. Cada forma puede formarse con ingredientes comúnmente utilizados en la industria elegidos apropiadamente por los expertos en la materia, además del principio activo, y puede aumentar el efecto con otros ingredientes.

La decisión de dosificación sobre el principio activo mencionado anteriormente está dentro del nivel de los expertos en la materia, y la dosificación diaria, por ejemplo, puede ser de 1 µg/kg/día a 10 mg/kg/día, más específicamente de 10 µg/kg/día a 1 mg/kg/día, más específicamente de 50 µg/kg/día a 100 µg/kg /día, pero no se limita a estos números y puede variar de acuerdo con la edad, el estado de salud, las complicaciones y otros factores diversos.

En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido para su uso en la prevención o el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos por encima del 80% de homología con la secuencia mencionada anteriormente, o un fragmento de péptido de los péptidos mencionados anteriormente.

En una realización de la presente invención, se proporciona un péptido para su uso en el procedimiento de prevención o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer con la aplicación de los péptidos mencionados anteriormente en pacientes.

En una realización de la presente divulgación, se proporciona un kit para profilaxis o tratamiento de enfermedades inflamatorias. El kit puede contener: un péptido con actividad antiinflamatoria o una composición que comprende el péptido, en el que el péptido comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, el péptido tiene una homología superior al 80% con la secuencia mencionada anteriormente, o el péptido es un fragmento de los péptidos mencionados anteriormente; e instrucciones que incluyen al menos una de dosis de administración, vía de administración, frecuencia de administración e indicación del péptido o composición.

Los términos usados en el presente documento están destinados a usarse para describir las realizaciones, no para limitar la presente invención. Los términos sin números delante no son para limitar la cantidad, sino para mostrar que puede haber más de una cosa del término utilizado. Las expresiones "que incluye/n", "que tiene/n", "que consiste/n" y "que comprende/n" se interpretará abiertamente (es decir, "que incluye/n pero sin limitación").

Se utiliza la mención del intervalo de números en lugar de indicar números separados dentro del intervalo, por lo que, a menos que se indique explícitamente, cada número puede leerse como números separados integrados en el presente documento. Los valores finales de todos los intervalos se incluyen en el intervalo y se pueden combinar de forma independiente.

A menos que se indique lo contrario o se contradiga claramente en contexto, todos los procedimientos mencionados en el presente documento pueden realizarse en el orden correcto. El uso de una cualquiera de las realizaciones y todas las realizaciones, o lenguaje ejemplar (por ejemplo, que usa "tipo~"), a menos que se incluya en las

reivindicaciones, se usa para describir más claramente la presente invención, no para limitar el ámbito de la presente invención. Cualquier lenguaje, en el presente documento, fuera de las reivindicaciones no debe interpretarse como una necesidad de la presente invención. A menos que se defina de otra manera, los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que la presente invención pertenece.

Las realizaciones preferidas de la presente invención son el mejor modo conocido por los inventores para realizar la presente invención. Puede resultar claro para los expertos en la materia después de leer las declaraciones antes de las variaciones en las realizaciones preferidas. Los presentes inventores esperan que los expertos en la materia puedan usar las variaciones de manera adecuada y que la presente invención se lleve a cabo de otras maneras distintas a las enumeradas en el presente documento. En consecuencia, la presente invención, de acuerdo con lo permitido por la ley de patentes, incluye equivalentes y variaciones de los mismos, de los puntos clave de la invención establecidos en las reivindicaciones adjuntas. Además, todas las variaciones posibles dentro de cualquier combinación de los componentes mencionados anteriormente se incluyen en la presente invención, a menos que se indique explícitamente lo contrario o se contradiga en contexto.

Se sabe que el factor de necrosis tumoral (TNF), particularmente TNF- α , se libera de las células inflamatorias y causa varias reacciones citotóxicas, reacciones inmunológicas y reacciones inflamatorias. Se sabe que TNF- α está involucrado en la aparición y prolongación de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias y además causa septicemia grave y shock séptico cuando se libera en la sangre y actúa sistémicamente. Debido a que TNF- α es un factor ampliamente asociado con el sistema inmunitario de un cuerpo vivo, el desarrollo de agentes que inhiben TNF- α se lleva a cabo activamente. TNF- α se biosintetiza en una forma inactiva y se convierte en una forma activa al ser escindido por proteasas; la enzima responsable de la activación se llama enzima convertidora del factor de necrosis tumoral (TACE). En consecuencia, una sustancia que inhibe esta TACE puede tratar, mejorar o prevenir enfermedades, afecciones patológicas, afecciones anormales, problemas, síntomas adversos y similares atribuidos al TNF- α (KR2011-0060940A).

La proteína de la caja 1 del grupo de alta movilidad (HMGB1) existe en altas concentraciones en timo, ganglios linfáticos, testículos y en hígado fetal, y con excepción de las células hepáticas y cerebrales, generalmente existe dentro del núcleo. Dicha proteína HMGB1 tiene 3 dominios que consisten en caja A, caja B y C-terminal.

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

La invención se describe además por las figuras, los siguientes ejemplos y experimentos, que tienen el único fin de ilustrar realizaciones específicas de la presente invención, y no deben interpretarse como limitantes del ámbito de la invención de ninguna manera.

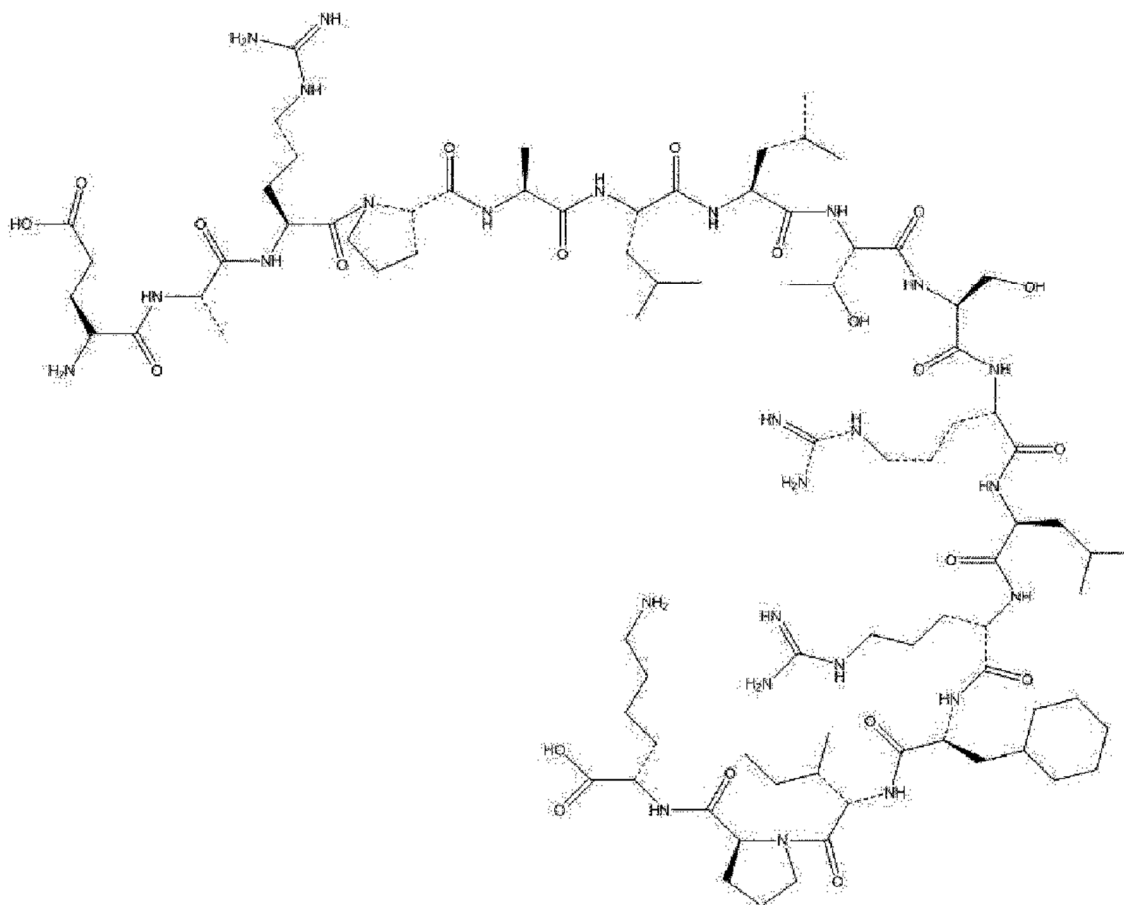
Ejemplo 1

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

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

Se sintetizó un péptido compuesto de 16 aminoácidos con la estructura química 1 que se muestra a continuación que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1 (PEP-1) derivada de la telomerasa humana:

<Estructura Química 1>



La SEQ ID NO: 1 (PEP-1) se sintetizó de acuerdo con el procedimiento existente de síntesis de péptidos en fase sólida. En concreto, los péptidos se sintetizaron acoplado cada aminoácido del extremo C a través de la síntesis de péptidos en fase sólida Fmoc, SPPS, usando ASP48S (Peptron, Inc., Daejeon ROK). Se utilizaron esos péptidos con su primer aminoácido en el extremo C unido a la resina de la siguiente manera:

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

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

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

Todos los materiales de aminoácidos para sintetizar el péptido se protegieron con Fmoc en el extremo N, y los restos de aminoácidos se protegieron con Trt, Boc, t-Bu (t-butiléster), Pbf (2,2,4,6,7-pentametil dihidro-benzofurán-5-sulfonilo) que se pueden 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, ácido Trt-Mercaptoacético.

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

Se sintetizó el péptido utilizando el almacén de fase sólida combinado para iniciar el aminoácido con la protección de aminoácidos, haciendo reaccionar los aminoácidos correspondientes por separado, lavando con disolvente y se desprotegió, y repitiendo el procedimiento. Después de cortar el péptido sintetizado de la resina, se purificó por HPLC y se verificó la síntesis por MS, y a continuación, se liofilizó.

El procedimiento de síntesis específico de PEP 1 se describe a continuación.

1) Acoplamiento

Se fundió el aminoácido (8 equivalentes) protegido con resina de $\text{NH}_2\text{-Lys(Boc)-2-clorotritilo}$ 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 ese 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 ese orden.

3) Se fabricó 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 de enfriamiento a la mezcla obtenida, y a continuación se usó la centrifugación para precipitar el péptido recogido.

6) Después de la purificación por Prep-HPLC, se verificó el peso molecular por LC/MS y se liofilizó para producir en forma de polvo.

Ejemplo 2

15 Medición de actividad antiinflamatoria de PEP-1

Cultivo de líneas celulares

- Las células de macrófagos RAW 264.7 (KCBL, 40071) del Banco de Células de Corea se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; PAA, Austria) que contenía suero bovino fetal al 10% (FBS; Gibco Laboratories), 100 unidades/ml de estreptomycin y penicilina (Gibco Laboratories) a 37 °C con CO al 5%. Se sembraron células Raw264.7 en una placa de 96 pocillos a una densidad de 1×10^6 células/ml y se incubaron durante la noche.

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

Experimento 2-1. Análisis de nivel de NO

- 30 Se midió nivel de óxido nítrico (NO) en células Raw 264.7 (1×10^6 células/ml) usando el sistema de reactivo Griess (Promega, EE. UU.). Se añadieron 50 µl de medio de cultivo a una placa de 96 pocillos y la solución de reactivo Griess I (NED) y de reactivo Griess II (solución de sulfanilamida) en la misma cantidad. Después de 10 minutos de incubación de las células con los reactivos, se midió la densidad óptica a 540 nm en 30 minutos usando un lector de microplacas (Molecular Devices, EE. UU.). La concentración de NO se calculó utilizando una curva patrón (0-100 µM) de Nitrito de sodio.

- 35 Como se muestra en la Tabla 2 a continuación, la estimulación de las células con LPS aumentó la expresión de NO, pero en el tratamiento conjunto con LPS y PEP-1, el nivel de expresión de NO mencionado anteriormente disminuyó. Se produce NO durante la inflamación, y el resultado que muestra el nivel de NO reducido por PEP-1 al 65% del control apoya fuertemente el efecto antiinflamatorio de PEP-1.

Tabla 2. La medición del efecto antiinflamatorio de PEP 1 derivada de telomerasa humana

Muestra de prueba		Nivel de Control de Expresión de NO (%)	Disminución del Nivel de Expresión de NO (%)
PBS		0	-
1 µg/ml de LPS	PBS	100	0
	PEP 1 (0,5 µg/ml)	35	65

40 Experimento 2-2. Análisis del efecto inhibidor de las citocinas

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

Diego).

Las placas de 96 pocillos se recubrieron con 100 µl de anticuerpos de captura (diluidos en tampón de recubrimiento a la concentración recomendada por el protocolo del fabricante) durante la noche a 4 °C. A continuación, después de lavar las placas 5 veces, se añadieron 200 µl de diluyentes de ensayo a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente para el bloqueo. Después de lavar cada pocillo con tampón de lavado cinco veces, la muestra de cultivo celular o cada muestra de proteína patrón de citocinas se diluyó y se añadieron 100 µl de cada una a cada pocillo. Las muestras que contenían la placa se incubaron durante la noche a 4 °C. A continuación, después de lavar la placa cinco veces con el tampón de lavado, se añadieron 100 µl de anticuerpo secundario conjugado a avidina y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de 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 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las placas siete veces, se añadieron 100 µl de solución TMB (Pierce) conjugado a avidina y se incubaron durante 15 min. a temperatura ambiente. La reacción se detuvo agregando 50 µl de H₂SO₄ 2N en cada pocillo. Se midió la densidad óptica a 450 nm usando un lector de microplacas. El análisis estadístico se realizó mediante análisis de varianza utilizando el procedimiento ANOVA del programa SPSS, y se verificó la significación entre los análisis mediante la prueba de intervalos múltiples de Duncan.

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

Como se muestra en la Tabla 3 a continuación, el tratamiento con LPS solo aumentó la secreción de la citocina IL-6 (interleucina-6). Sin embargo, el tratamiento conjunto con LPS y PEP-1 mostró una disminución en el nivel de la secreción de la citocina proinflamatoria IL-6. Lo que es más importante, después del tratamiento con PEP-1, el nivel de secreción de citocina proinflamatoria disminuyó más del 70%, lo que indica un fuerte efecto antiinflamatorio de PEP-1.

Tabla 3. Inhibición de la producción de la citocina IL-6 por PEP-1

Muestra de prueba		producción de citocina IL-6	
		% de control	% de inhibición
PBS		0	-
1 µg/ml de LPS	PBS	100	0
	PEP 1 (5 µg/ml)	28	72

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

Se determinó el nivel de expresión de proteínas mediante análisis de transferencia Western. Las células cultivadas en medio que contenía PEP-1 se lavaron con PBS, se trataron con tripsina-EDTA al 0,05% y se recogieron por centrifugación. Las células recogidas se disolvieron en un volumen apropiado de tampón de lisis. Los residuos intracelulares se sedimentaron por centrifugación, y se separó la misma cantidad de proteína de cada muestra por electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. La proteína separada se transfirió a la membrana de nitrocelulosa (Schleicher and Schuell, Keene, NH, EE. UU.), Keene, NH, EUA), a continuación, se analizó por el anticuerpo específico para 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 proteínas de acuerdo con el nivel de exposición mostrado en la película de rayos X.

El análisis de transferencia Western se realizó para determinar el efecto inhibitorio de PEP-1 sobre la expresión de las proteínas citocinas. Como se muestra en la Tabla 4 a continuación, la estimulación de las células con LPS aumentó la expresión de las citocinas; HMGB1, TNF-α y COX. Sin embargo, si las células se trataron con LPS y PEP-1, el nivel de expresión de las citocinas proinflamatorias mencionadas anteriormente disminuyó. El resultado que muestra que el tratamiento con PEP-1 disminuyó los niveles de citocinas proinflamatorias en más del 70% proporciona evidencia sólida que respalda el efecto antiinflamatorio de PEP-1.

Tabla 4. La medición del efecto inhibitorio de PEP-1 sobre el nivel de expresión de citocinas proinflamatorias.

Muestra de prueba		Nivel de Expresión de Citocinas (intensidad de banda) % de control		
		HMGB1	TNF- α	COX-2
PBS		-	-	-
1 μ g/ml de LPS	PBS	100	100	100
	PEP 1 (5 μ g/ml)	30	25	22

Ejemplo 3

Investigación del efecto inhibitor de PEP-1 sobre el nivel de TNF- α en células HepG2

5 Experimento 3-1: Cultivo celular

Se separaron PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de las muestras de sangre (50 ml) recogidas de sujetos sanos utilizando Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ, EE.UU.). Las PBMC se enriquecieron, a continuación, en medio RPMI 1640 completo que contenía un 20% de suero humano, seguido de transferencia a una placa de cultivo celular de poliestireno de 100 mm recubierta con suero humano durante 30 minutos. Después de 2 horas de incubación a 37 °C y CO₂ al 5%, los monocitos se separaron del fondo de la placa de cultivo celular usando PBS frío (Solución Salina Tamponada con Fosfato) (Gibco/life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) y se cultivaron 1 x 10⁵ células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos en medio RPMI 1640 (complementado con penicilina-estreptomina; 100 mg/ml, suero humano; 20%) durante la noche.

Para el análisis con luciferasa, se usaron células HEK293/null (de riñón embrionario humano) y HEK293/TRL que expresan de forma estable TLR2 (receptor tipo toll2) obtenido de la Escuela de Medicina Dental de la Universidad Nacional de Seúl. Un día antes del experimento con luciferasa, se sembraron 2,5 x 10⁵ células en cada pocillo de una placa de 12 pocillos y se cultivaron durante la noche en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (complementado con blasticidina; 10 μ g/ml, suero fetal bovino; 10 %)(Invitrogen/life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.)

20 Experimento 3-2: Ensayo de citocinas

Para ver el efecto de PEP-1 sobre el nivel de TNF- α en términos del nivel de expresión de proteínas, se realizó ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas). Se cultivaron 1 x 10⁵ monocitos derivados de PBMC en una placa de 96 pocillos durante la noche. Después de eso, se trataron con LPS (lipopolisacárido; 10 ng/ml, Sigma) durante 2 horas, seguido de 3 lavados con PBS. A continuación, se trataron con medio OPTIMEM (Invitrogen/life Technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) durante una hora para inducir la inanición, y se trataron con 4 μ M de FITC (isocianato de fluoresceína), FITC-TAT, PEP-1-FITC y FITC-PEP-1 durante 2 horas antes de medir el nivel de TNF- α . Después del cultivo, se recogió la sopa celular y se midió la cantidad de TNF- α usando el kit ELISA (R&D, Minneapolis, MN, EE. UU.) de la siguiente manera:

la medición de TNF utiliza el procedimiento ELISA sándwich. Se añadieron 100 μ l de anticuerpo primario de TNF- α a cada pocillo de la placa de 96 pocillos recubierta previamente, y la placa se incubó a 4 °C durante la noche. Al día siguiente, la placa se lavó 3 veces con solución de lavado Tween20 al 0,5% durante 5 minutos cada vez, y, a continuación, se añadieron 100 μ l de cada muestra y solución patrón y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar la placa como anteriormente, se añadieron 100 μ l de anticuerpo secundario conjugado con HRP en cada pocillo y se dejó a temperatura ambiente durante 2 horas. De nuevo, se lavó la placa y se añadió avidina/biotina para medir la absorbancia. El nivel de TNF- α de cada muestra se cuantificó utilizando el gráfico patrón calculado a partir de la absorbancia de la solución patrón.

Los monocitos derivados de PBMC se estimularon con endotoxina LPS (10 ng/ml) durante 2 horas, se privaron de alimento durante 1 hora utilizando OPTI-MEM, y, a continuación, se trataron con 4 μ M de FITC, FITC-TAT, PEP 1-FITC y FITC-PEP 1 durante 2 horas. Después de la incubación, se midió el nivel de TNF- α se midió con medio de cultivo celular usando ELISA. Como resultado, en el caso de FITC y FITC-TAT, el nivel de TNF- α aumentó debido a LPS (6,2 y 6,7ng/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 Luciferasa

Para investigar el papel de PEP 1 en la respuesta inflamatoria, se evaluaron los patrones de expresión de NF- κ B a través del análisis de luciferasa. Primero, se incubaron HEK293/null y HEK293/TLR2 (Escuela de Graduados de Odontología, Universidad Nacional de Seúl) en una placa de 12 pocillos durante 24 horas, para obtener 2,5 x 10⁵

células/pocillo. Después de lavar tres veces con PBS, se reemplazó el medio con OPTI-MEM (Invitrogen/life Technologies, Carlsbad, CA, USA) y se incubaron durante 4 horas, y, a continuación, se añadió una mezcla de 3 µl de lipofectamina (Invitrogen/life Technologies), 1 µg de luciferasa NF-κB y luciferasa de renilla larga (Promega, Madison, WI, EE. UU.) en cada pocillo y se incubaron nuevamente durante 4 horas. Se colocó lipoproteína pam3cys (10 ng/ml, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) en todos los pocillos, excepto los de control negativo, y se trataron con FITC (4 µM) y FITC-PEP 1 (4 µM) durante 18 horas antes de lavarlo con PBS tres veces. Se confirmó la activación de NF-κB a través del luminómetro TD-20/20 (Turner designs, Sunnyvale, CA, EE. UU.) después de la disolución (lisis) de las células al poner 50 µl de tampón de lisis pasivo, proporcionado por el sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega) - en cada pocillo. La eficacia de la transfección se confirmó por cotransfección de pCMV-luciferasa de renilla (Promega), y se analizaron los resultados calibrando los valores de luciferasa.

Después de transfectar la luciferasa NF-κB a líneas celulares HEK293/null y HEK293/TLR2, se trataron conjuntamente con pam3cys, una lipoproteína sintética y FITC (4 µM), un control negativo, y se trataron nuevamente con pam3cys con FITC-PEP 1 (4 µM) para cultivarlas durante 18 horas. La medición de los patrones de expresión de NF-κB por la resistencia de la luciferasa a través de la lisis de las células con tampón de lisis pasivo, proporcionado por el sistema de ensayo de indicador de luciferasa dual (Promega), mostró que no había diferencia en células HEK293/null tratadas o con lipoproteína o FITC-PEP-1 no tratadas. Sin embargo, cuando se trató la línea celular HEK293/TLR2 con la lipoproteína, un agonista de TLR2, la expresión de NF-κB aumentó ($P < 0,01$) en comparación con la no tratada, lo que confirma la aparición de respuestas inflamatorias. También, la expresión de NF-κB aumentó cuando se trató conjuntamente con FITC-PEP 1 en comparación con la de la no tratada; y la expresión disminuyó en comparación con el control negativo en el que se trataron juntos con la lipoproteína y FITC ($P < 0,01$) (FIG.2). Finalmente, se pudo confirmar que la respuesta inflamatoria que puede ser causada por TLR 2 se reduce cuando se trata en conjunto con PEP 1.

Experimento 3-4: Reanálisis de péptidos que afectan los niveles de citocinas en la línea celular THP1

Como una línea celular de leucemia monocítica aguda humana, se usó la línea celular de monocitos THP-1 (American Type Culture Collection (Manassas, VA, EE. UU.) para reconfirmar los efectos de PEP 1. Las células se cultivaron a una densidad de $0,5-7 \times 10^5$ células/ml en RPMI 1640 que contenía FBS al 10%, 2-mercaptoetanol 0,05 mM, 100U/ml de penicilina, 100 µg/ml estreptomycin y se mantuvieron a 37 °C con CO₂ al 5%. Las células THP-1 se diferenciaron en macrófagos tratando células con acetato de miristato de forbol (PMA) a 100 ng/ml a 37 °C durante 24 horas.

Todos los reactivos y el medio se adquirieron de Gibco BRL. El PMA, LPS y 2-mercaptoetanol se adquirieron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). El péptido para RIA se sintetizó a partir de Peptron (Daejeon, República de Corea). El kit de PCR de transcripción inversa se adquirió de Promega (Madison, WI, E.E.U.U.). RT² SYBR® Green qPCR Mastermix_reagents y QIAzol se adquirieron de QIAGEN (Valencia, CA, EE.UU.).

Después de la diferenciación en macrófagos, las células THP-1 se lavaron dos veces usando RPMI 1640 completo (5 min/lavado). A continuación, las células se trataron durante 4 h. con 10 ng/ml de LPS y/o péptido para RIA 4 µM en RPMI 1640 sin FBS.

El total de muestras de ARN se aisló de las células THP-1 tratadas con péptidos utilizando el reactivo Trizol (QIAzol) y el ADNc se sintetizó mediante PCR de transcriptasa inversa utilizando el kit de PCR de transcripción inversa de Promega siguiendo el protocolo del fabricante.

A continuación, se realizó una qPCR en tiempo real utilizando el instrumento CFX96 (Bio-Rad) con el sistema SYBR Green. Los cebadores utilizados en los experimentos se encuentran en la Tabla 5. Las condiciones de ciclo de la PCR fueron 95 °C durante 10 minutos para la activación de la polimerasa HotStart DNA Taq, seguidas de 45 ciclos de 95 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos. Todas las muestras se midieron por triplicado y las diferencias en la expresión génica se calcularon utilizando el procedimiento de umbral de 2 ciclos. Todos los datos se normalizaron contra β actina (gen constitutivo) y se presentaron como medias de +/- EEM de al menos tres experimentos independientes.

Tabla 5.Cebadores usados para análisis por qRT-PCR.

Nombre del gen	Secuencia de ADN
<i>TNF-alfa</i>	(directo) 5'-CTATCTGGGAGGGGTCTTCC-3' (inverso) 5'-ATGTTCTGCTCCTGCTCACAGG-3'
<i>il-1 beta</i>	(directo) 5'-GGACAAGCTGAGGAAGATGC-3' (inverso) 5'-TCGTTATCCCATGAGTCGAA-3'

(continuación)

Nombre del gen	Secuencia de ADN
<i>IL-6</i>	(directo) 5'-AAAAGTCCTGATCCAGTTCCTG-3' (inverso) 5'-TGAGTTGTCATGTCCTGCAG-3'
<i>IL-8</i>	(directo) 5'-GTGCAGTTTTGCCAAGGAGT-3' (inverso) 5'-AATTTCTGTGTTGGCGCAGT-3'
<i>iNOS</i>	(directo) 5'-CACCATCCTGGTGGAACTCT-3' (inverso) 5'-TCCAGGATACCTTGGACCAG-3'
<i>beta actina</i>	(directo) 5'-AGAAAATCTGGCACCACACC-3' (inverso) 5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'

Como se muestra en la FIG. 3, las citocinas involucradas en las respuestas inflamatorias disminuyeron notablemente al tratar con PEP 1.

Ejemplo 4

Análisis de la respuesta inflamatoria inducida por la proteína β -amiloide

- 5 HMGB1 primero se somete a acetilación y translocación al citoplasma por estimulación externa. A continuación, se secreta fuera de la célula, por lo tanto, cumple el papel de citocina que causa inflamación. Porque cuando uno tiene una inflamación debido a dicha actividad, la proteína HMGB1 se secreta de la célula, y los pacientes con enfermedades inflamatorias como el síndrome de Churg Strauss, la artritis reumatoide y el síndrome de Sjögren presentarán niveles en suero elevados de HMGB1. Por lo tanto, si el núcleo contiene una gran cantidad de HMGB1, incluso cuando hay un estímulo que causa inflamación, esto sugiere el hecho de que HMGB1 no se secreta fuera de la célula, lo que significa que se está suprimiendo la inflamación.

Experimento 4-1: Análisis de supervivencia y proliferación de células madre neuronales por los efectos antiinflamatorios de PEP-1

En primer lugar, se preparó PEP-1 de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en el Ejemplo 1.

15 Experimento 4-2: Cultivo de células madre neuronales y evaluación de toxicidad de β -amiloide

- Después de extraer la corteza de la cabeza de una rata embrionaria que había estado gestándose durante 13 días, se cultivó durante una semana con el Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF) para obtener las células madre neuronales. Para analizar los efectos de la proteína β -amiloide en las células madre neuronales, la proteína β -amiloide oligomerizada previamente de concentraciones de 0 a 40 μ M se trató sobre células madre neuronales durante 48 horas, a continuación, se usó el ensayo CCK-8, BrdU y el ensayo TUNEL para la evaluación de la citotoxicidad (consúltese BA Yankner y col., 1990 y KN Dahlgren y col., 2002). Se usó la misma concentración de proteína β -amiloide en experimentos posteriores después de confirmar que la supervivencia celular se reducía al 60% cuando se procesaron con proteína β -amiloide 20 μ M (consúltese las FIG. 4 y 5).

Experimento 4-3: Evaluación de toxicidad celular por tratamiento con PEP-1

- 25 Para evaluar el impacto de PEP-1 sobre las células madre neuronales cultivadas, las células madre neuronales se cultivaron primero mediante un procedimiento bien conocido (BA Yankner y col., 1990 y KN Dahlgren y col., 2002). A continuación, se trataron con diferentes concentraciones (0, 1, 10, 50, 100, 200 μ M) de PEP-1 durante 48 horas, seguido de evaluaciones de viabilidad y proliferación celular utilizando el ensayo MTT, el ensayo BrdU y el ensayo TUNEL. Las concentraciones de PEP-1 de 0 a 200 μ M parecían estables en el sistema neuronal ya que no inhibían ni la supervivencia ni la proliferación de células madre neuronales (consúltese las Fig. 6 y 7).

Experimento 4-4: Evaluación de la toxicidad celular mediante tratamiento conjunto de proteína β -amiloide y péptido de telomerasa

- 35 Para determinar si PEP 1 tiene el efecto de supresión de la neurotoxicidad causada por la proteína β -amiloide, se trató de manera conjunta con proteína β -amiloide 20 μ M y varias concentraciones de PEP-1 durante 48 horas. La viabilidad celular y la apoptosis se midieron usando el ensayo MMT, el ensayo CCK-8, el ensayo de LDH y el ensayo TUNEL, y la proliferación de células madre neuronales mediante el ensayo de BrdU.

- Los resultados del ensayo MMT y el ensayo CCK-8 confirmaron que PEP-1 10 μ M comenzó a proteger las células madre neuronales de la neurotoxicidad por β -amiloide, y la protección más eficaz se proporcionó a 100 μ M. Consúltese la FIG. 8). El ensayo de LDH se realizó para evaluar el grado de muerte celular como otro procedimiento, y se confirmó que el aumento de la muerte celular por β -amiloide disminuyó por PEP-1, y se observó eficacia comenzando a una concentración de 1 μ M (consúltese la FIG. 9).

También se confirmó con el ensayo BrdU que la disminución de la proliferación celular debido a la proteína β -amiloide se restableció cuando se procesó con PEP-1 (consúltese la FIG. 10).

La movilidad celular es una cuestión vital debido a la naturaleza de las células madre neuronales. De acuerdo con los resultados experimentales de la movilidad celular, se confirmó que la disminución de la proliferación celular debido a la proteína β -amiloide se restableció cuando se procesó con PEP-1, y que aumentó aún más cuando estaba en una concentración de 10 μ M, en comparación con el control. Esto sugiere que en los ensayos clínicos futuros, el procesamiento previo al trasplante de células madre puede arrojar resultados más eficaces. Consúltese la FIG. 11).

Para confirmar el grado de daño de las células madre neuronales, se realizó el ensayo TUNEL. Se observó que la muerte de células madre neuronales aumentó significativamente en el grupo de tratamiento con proteína β -amiloide 20 μ M, y la muerte de células madre neuronales disminuyó cuando se trataron con PEP 1 de 1 a 100 μ M. Consúltese la FIG. 12)

Se investigó el mecanismo de acción del efecto protector de PEP-1 sobre la apoptosis por la proteína β -amiloide. Primero, se investigó si PEP-1 es capaz de minimizar el daño oxidativo causado por la proteína β -amiloide. El cambio en la generación de especies reactivas de oxígeno después del tratamiento con proteína β -amiloide y PEP-1 se observó mediante el uso de tinción con DCFDA (Molecular Probes, Eugene, OR). En el grupo en el que las especies reactivas de oxígeno aumentaron debido a proteína β -amiloide 20 μ M, el aumento de especies reactivas de oxígeno disminuyó por el tratamiento con PEP-1 (1 μ M, 10 μ M, 50 μ M) (consúltese la FIG. 13).

Experimento 4-5: Análisis comparativo de los niveles de expresión de proteínas entre los grupos tratados con y sin PEP-1

El nivel de expresión de proteínas del grupo tratado con PEP-1 y el grupo sin tratar se analizó mediante la técnica de electroforesis 2D y la técnica de micromatrices de anticuerpos. Se prepararon 200 μ g extrayendo proteoma de las células madre neuronales cultivadas en el Experimento 3-1 del Ejemplo 3. Además, el grupo en el que no se trató con PEP-1 se utilizó como grupo de comparación en la misma condición.

La electroforesis en 2D se realizó utilizando geles de acrilamida al 12%. La primera electroforesis en gel se realizó a PI 4-10N, usando un tamaño de gel de 8,5x7 cm. Después de la electroforesis, se tiñó con Azul de Coomassie Coloidal, y, a continuación, se comparó la expresión usando el software PDQuest para analizar cada mancha.

Se identificó una diferencia en los niveles de expresión de más de 1,5 veces usando MALDI-TOF MS (Espectrometría de Masas por Tiempo de Vuelo de Ionización/Desorción Matricial). Entre estos, se identificaron proteínas correlacionadas con la señalización relacionada con la inflamación, como i-NOS y HMGB-1 (consúltese la Tabla 6). Los cambios en los niveles de expresión de proteínas aumentaron o disminuyeron en 1,5 veces por la proteína β -amiloide, pero se confirmó que el nivel de expresión estaba regulado cercano al control negativo cuando se añadió PEP-1 (consúltese la FIG. 14).

La micromatriz de anticuerpos se llevó a cabo utilizando el kit de señalización celular (CSAA1, kit de señalización celular PanoramaTM Ab Microarray), los portaobjetos de matriz se escanearon con el escáner GenePix Personal 4100A (Molecular Devices) y los datos se analizaron con GenePix Pro 5.0 (Molecular Devices).

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

Con los resultados del análisis, se confirmó que, como se sugiere en la Tabla 6 a continuación, PEP-1 controló la sobreexpresión o subexpresión de proteínas relacionadas con la inflamación; el nivel de expresión de proteínas fue cercano al del grupo de control negativo.

Tabla 6

Proteína	Control negativo	grupo tratado con 20ug de β -amiloide (aumento)	grupo tratado con 20ug de β -amiloide+PEP 1 (aumento)
HSP 70	1,0	-2,3	1,2
HSP 90	1,0	-1,8	1,0
HMGB1	1,0	-1,5	2,8
GADD 153	1,0	1,6	1,2
i-NOS	1,0	1,9	-1,1

(continuación)

Proteína	Control negativo	grupo tratado con 20ug de β -amiloide (aumento)	grupo tratado con 20ug de β -amiloide+PEP 1 (aumento)
e-NOS	1,0	1,9	-1,1
Pyk2	1,0	2,0	1,2
MAP Quinasa	1,0	2,2	1,0

La vía de señalización de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/AKT desempeña una función crucial en el crecimiento y la supervivencia de las células madre neuronales. La vía de PI3K se activa por factores de crecimiento y factores reguladores, y participa en la regulación normal del crecimiento y la supervivencia de las células madre neuronales. Las vías de señalización de AKT desactivan varios factores proapoptóticos, incluida una conocida molécula de señalización apoptótica, GSK3 β .

Para investigar más a fondo los efectos antiinflamatorios de PEP-1, se realizó transferencia Western sobre HMGB1, ya que mostró un cambio importante en el análisis de proteínas. Como resultado, el procesamiento de PEP-1 aumentó los niveles de expresión de proteínas en proteínas antiapoptóticas tales como Ki67, pAKT, PI3K, HSTF-1 y Bcl-2, y disminuyó los niveles de expresión de proteínas de señales apoptóticas tales como Bax, GSK3 β , citocromo- c, caspasa-3 (consúltese la FIG. 15).

HMGB1, una proteína de estructura no histónica que se une al ADN, desempeña diversos papeles dentro de una célula; tal como estabilizar la estructura del nucleosoma y regular la expresión génica. Como una de las sustancias causantes de inflamación que se excreta en la fase tardía de la respuesta inflamatoria, los macrófagos y los monocitos lo excretan cuando se estimula la inflamación, pero cuando la neurona se daña significativamente y conduce a la necrosis celular, se excretará fuera de la célula, causando una respuesta inflamatoria intensa. El aumento de HMGB1 por el tratamiento con PEP-1 después de la disminución del tratamiento con β -amiloide en el citoplasma de las células nerviosas refleja el hecho de que PEP-1 inhibe la secreción de HMGB1 fuera de la célula causada por la muerte de las células neuronales; por lo tanto, sugiere que PEP-1 tiene potentes efectos antiinflamatorios (consúltese la FIG. 15).

Además, se investigó la respuesta de PEP-1 a la agregación de β -amiloide. La agregación de la proteína se inhibió cuando se trató con PEP-1 (consúltese la Figura 16 (A)) en la inducción de la agregación de β -amiloide, y la proteína sufrió degradación cuando se trató con PEP-1 sobre la proteína β -amiloide que ya se indujo para la agregación (Consúltese la FIG. 16 (B)).

En el mecanismo de acción de PEP-1, se ha confirmado previamente el aumento de la señalización de supervivencia celular y la disminución de la señalización de apoptosis de PI3K. Para investigar si estos efectos son directos o indirectos, se trató con inhibidor de PI3K, LY294002 (Promega). Como resultado, el aumento de la viabilidad celular tras tratar con PEP 1 disminuyó cuando se trató con LY294002. En consecuencia, se puede concluir que PI3K está directamente asociado con el efecto neuroprotector de PEP 1 (consúltese la FIG. 17).

PEP-1 inhibe la apoptosis de las células madre neuronales por la proteína β -amiloide. También, se confirmó la mejora de la movilidad celular de las células madre neuronales, lo que sugiere una variedad de posibilidades en la aplicación clínica. Los efectos de inhibición de la neurotoxicidad causados por la proteína beta-amiloide se verificaron mediante el efecto antiinflamatorio del mecanismo de acción de PEP 1, el aumento de los factores de supervivencia de las células madre neuronales y la disminución de los factores apoptóticos, especialmente la activación de la vía de señalización de PI3K y los efectos antioxidantes.

Ejemplo 5

Matriz de qPCR

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Cultivo de células THP-1

Las células THP-1 (línea celular derivada de leucemia monocítica humana) se adquirieron de ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, EE. UU.) y se cultivaron en medio RPMI-1640 (Life technologies, Carlsbad, CA, EE. UU.) complementado con FBS al 10% (Life technologies), penicilina/estreptomina al 1% (Life technologies) y 2-mercaptoetanol 0,05 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) a 37 °C en CO₂ al 5%. Las células THP-1 que normalmente crecen en suspensión se diferenciaron en un fenotipo adherente tipo macrófago en medio de diferenciación (medio de crecimiento completo que contiene 100 ng/ml de 13-acetato de 12-miristato de forbol (PMA, Sigma-Aldrich)) durante 24 horas. Para la diferenciación, se sembraron células THP-1 (3 x 10⁶ células/placa, -95% de confluencia) en placas de cultivo de tejidos de 10 cm y se incubaron en medio de diferenciación.

Tratamiento de células THP-1 con péptido antiinflamatorio, PEP-1

Después de la diferenciación, las células THP-1 tipo macrófago se lavaron dos veces usando medio de crecimiento completo. A continuación, las células se trataron con 10 ng/ml de lipopolisacárido (Sigma-Aldrich) y/o PEP-1 4 μ M durante 4 horas a 37 °C.

Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc a partir de células THP-1

- 5 El ARN total se extrajo y purificó utilizando el mini kit RNeasy de Qiagen (Valencia, CA, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Los ADNc se sintetizaron mediante transcripción inversa utilizando el sistema de transcripción inversa de Promega (Madison, WI, EE. UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Matrices de PCR

- 10 A continuación, las muestras de ADNc de las células THP-1 se usaron como molde para el análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR). Para el análisis de qPCR, se adquirieron kits de matriz de PCR RT² Profiler de SABiosciences/Qiagen (Valencia, CA, EE.UU.). Cuatro kits de matriz de PCR diferentes que analizan rutas de señalización separadas utilizadas en el experimento son los siguientes: buscador de vía de transducción de señal humana, citocinas y receptores inflamatorios humanos, factores de transcripción humana, vía de señalización de NF- κ B humana. La PCR se realizó con el sistema de detección SYBR Green (Qiagen) utilizando un instrumento de PCR
- 15 en tiempo real CFX 96 Bio-Rad (Mercurio, CA, EE. UU.). Las condiciones de termociclado fueron: 95 °C durante 10 segundos; 55 °C durante 30 segundos; 95 °C durante 10 min; 95 °C durante 10 segundos, 55 °C durante 30 segundos y 72 °C durante 30 segundos durante 50 ciclos de amplificación. Los datos representan el valor promedio de tres experimentos independientes, y el % de disminución se determinó mediante la expresión del gen diana en muestras tratadas con LPS frente a muestras tratadas con LPS + PEP-1. Entre 336 genes analizados, se muestran el al tabla 7 solo aquellos que muestran una disminución del % estadísticamente significativa ($p < 0.05$, prueba t de Student).
- 20

RESULTADOS

Tabla 7. PEP-1 inhibe los genes que se muestran en la tabla anterior (*, genes diana NF- κ B que contienen sitios de unión de consenso NF- κ B en la región promotora).

Vía de señalización	Gen	% de disminución por PEP 1 (LPS+PEP-1/IPS), $p < 0,05$
	TNF α *	↓↓ 34 %
	IL10 *	↓↓ 32 %
	IL1Ra *	↓ 20 %
	IL17C	↓↓ 35 %
	G-CSF *	↓↓↓ 48 %
	GM-CSF *	↓↓ 29 %
	CCL4/MIP1 β *	↓ 22 %
	CCL26/MIP4 α	↓↓↓ 42 %
Familia de Receptores TNF	TNFR11B	↓↓↓ 38 %
	CD40Ligand	↓ 18 %
Biosíntesis de lípidos	ACSL5 (acil-coA sintasa)	↓ 17 %
Apoptosis	BCL10	↓↓ 32 %
NF κ B	I κ B α	↓↓ 27 %

- 25 PEP-1 inhibió la transcripción de genes que se muestran en la Tabla 7 con el % de inhibición calculado como la proporción en el nivel de transcripción entre muestras tratadas con LPS frente a muestras tratadas con LPS+PEP-1 (células THP-1). Entre los 336 genes analizados, solo los 13 genes en la Tabla 7 mostraron una disminución estadísticamente significativa después del tratamiento con PEP-1. Esos genes se pueden agrupar en diferentes categorías funcionales, que incluyen quimiocinas y citocinas, señalización del receptor de TNF α , metabolismo de lípidos, apoptosis y señalización de NF- κ B. Lo que es más importante, los genes en la categoría de quimiocinas y
- 30 citocinas se conocen como genes diana de NF- κ B, que tienen sitios de unión de ADN de consenso de NF- κ B en sus regiones promotoras. Tomados en conjunto, los datos de las matrices de PCR respaldan que PEP-1 puede ejercer efectos antiinflamatorios al modular el regulador maestro de la inflamación NF- κ B, y al hacerlo, PEP-1 puede usarse como agente terapéutico antiinflamatorio en una amplia gama de enfermedades inflamatorias.

LISTADO DE SECUENCIAS

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

<120 > PÉPTIDOS ANTIINFLAMATORIOS Y COMPOSICIÓN QUE COMPRENDE LOS MISMOS

5 <130> 19669PCT00

<150> KR 10-2012-0050529
<151> 11-05-2012

<150> KR 10-2012-0050533
<151> 11-05-2012

10 <150> KR 10-2012-0071989
<151> 02-07-2012

<150> KR 10-2012-0104144
<151> 19-09-2012

15 <150> KR 10-2012-0104207
<151> 19-09-2012

<150> PCT/EP2013/055329
<151> 15-03-2013

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

20 <210> 1
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 1

	Glu	Ala	Arg	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Ser	Arg	Leu	Arg	Phe	Ile	Pro	Lys
25	1				5					10					15	

<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador directo para TNF-alfa

<400> 2
ctatctggga ggggtcttc 20

35 <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador inverso para TNF-alfa

40 <400> 3
atgttcgtcc tgctcacagg 20

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> cebador directo para il-1 beta

	<400> 4	
	ggacaagctg aggaagatgc	20
5	<210> 5	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para IL-1 beta	
10	<400> 5	
	tcgttatccc atgagtcgaa	20
	<210> 6	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> cebador directo para IL-6	
	<400> 6	
	aaaagtctctg atccagtcc tg	22
20	<210> 7	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para IL-6	
25	<400> 7	
	tgagttgtca tgcctgcag	20
	<210> 8	
	<211> 20	
	<212> DNA	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para IL-8	
	<400> 8	
	gtgcagtttt gccaggagt	20
35	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
40	<223> cebador inverso para IL-8	
	<400> 9	
	aatttctgtg ttggcgcagt	20
	<210> 10	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para inos	
50	<400> 10	
	caccatcctg gtggaactct	20

	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> cebador inverso para inos	
	<400> 11	
	tccaggatac ctggaccag	20
10	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador directo para beta actina	
15	<400> 12	
	agaaaatctg gcaccacacc	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
20	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador inverso para beta actina	
	<400> 13	
	ggggtgtga aggtctcaa	20
25		

REIVINDICACIONES

1. Un péptido con actividad antiinflamatoria, en el que el péptido comprende

(a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, o

(b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, o

(c) un fragmento de la secuencia de aminoácidos de (a) o (b)

para su uso en el tratamiento o la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

2. El péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en, como máximo, 30 aminoácidos.

3. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, o 26 restos de aminoácidos.

4. El péptido para el uso de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1.

5. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores como principio activo para su uso en el tratamiento o prevención de la enfermedad de Alzheimer.

FIG.1

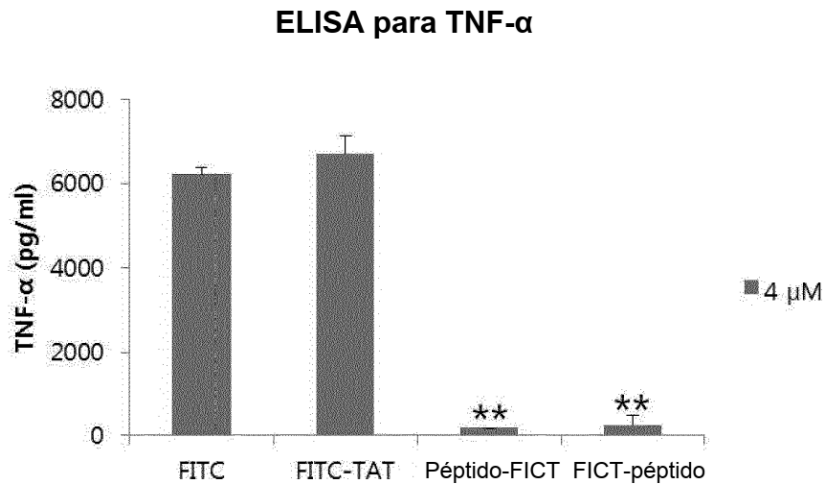


FIG.2

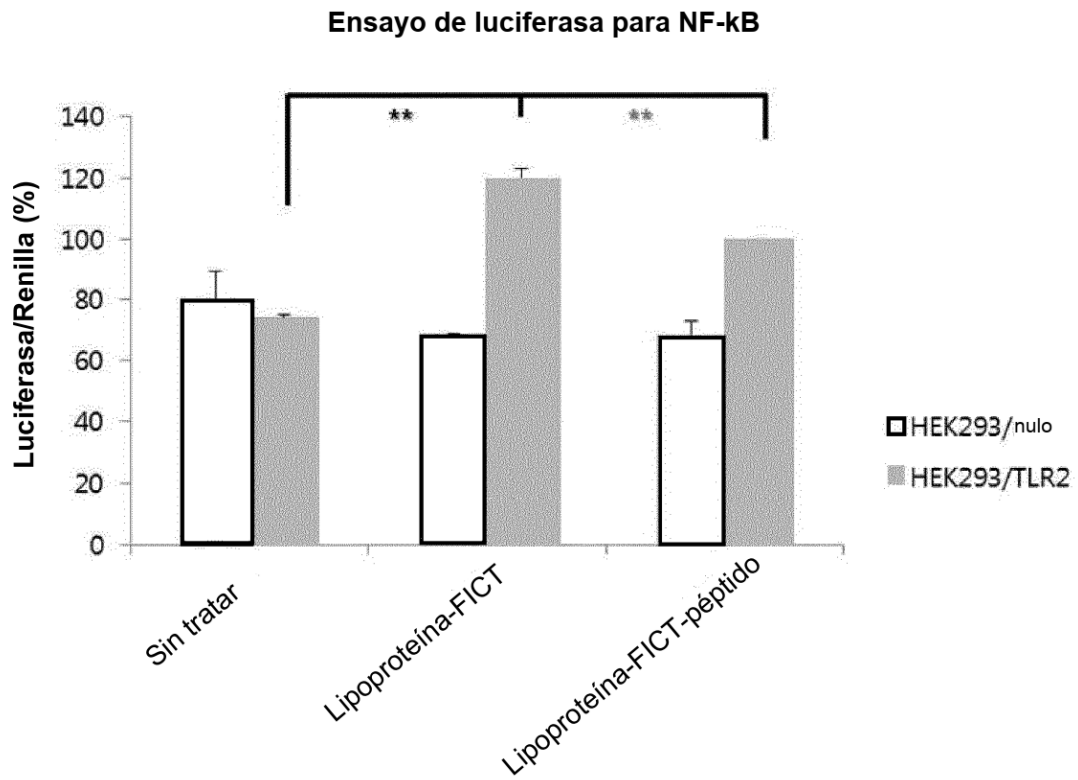
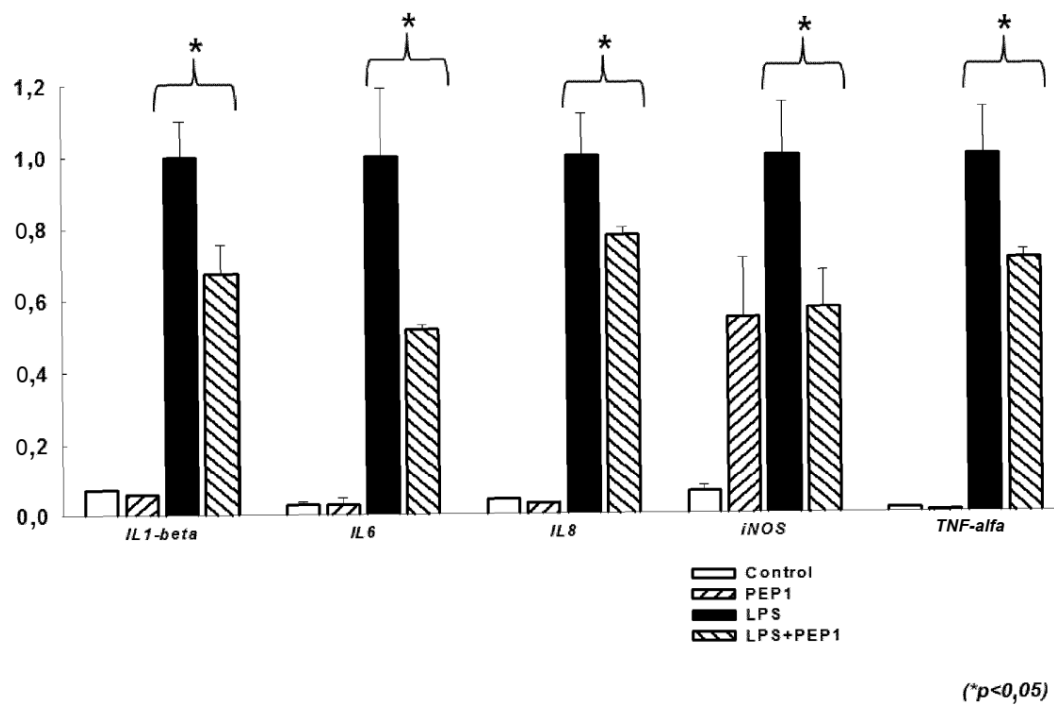


FIG.3



Viabilidad celular

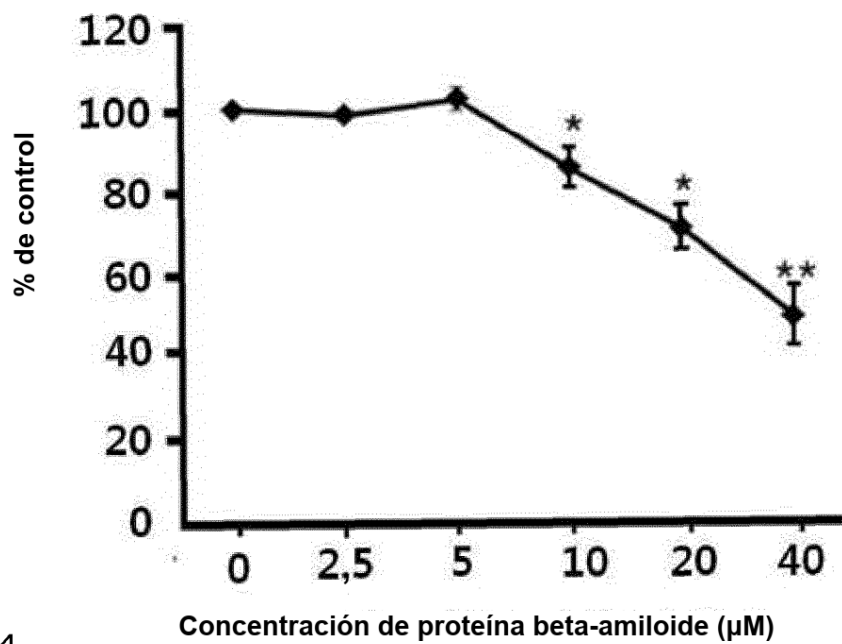


FIG.4

FIG.5

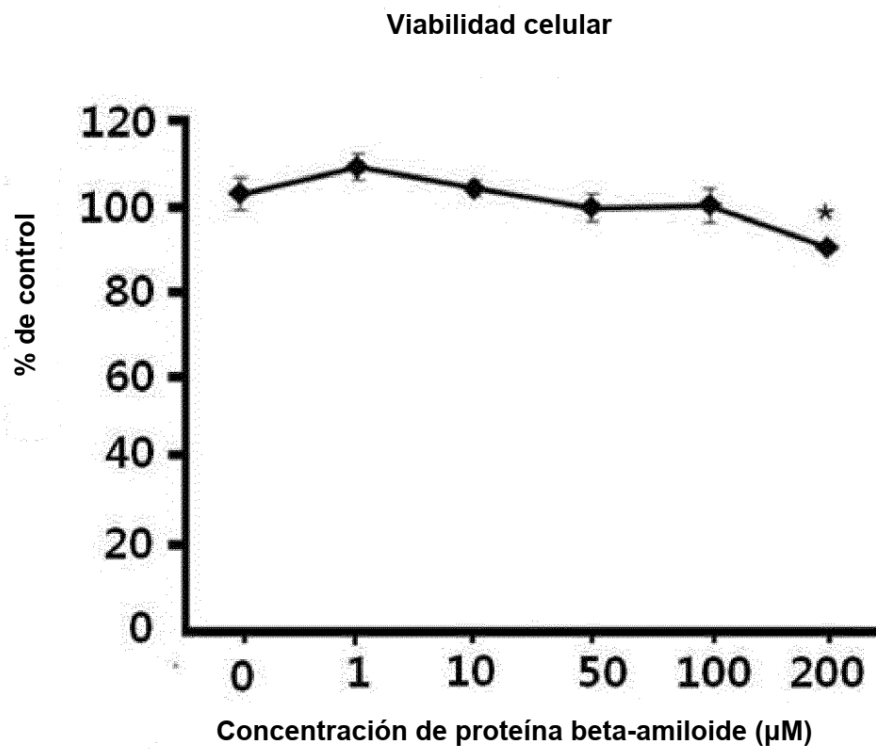
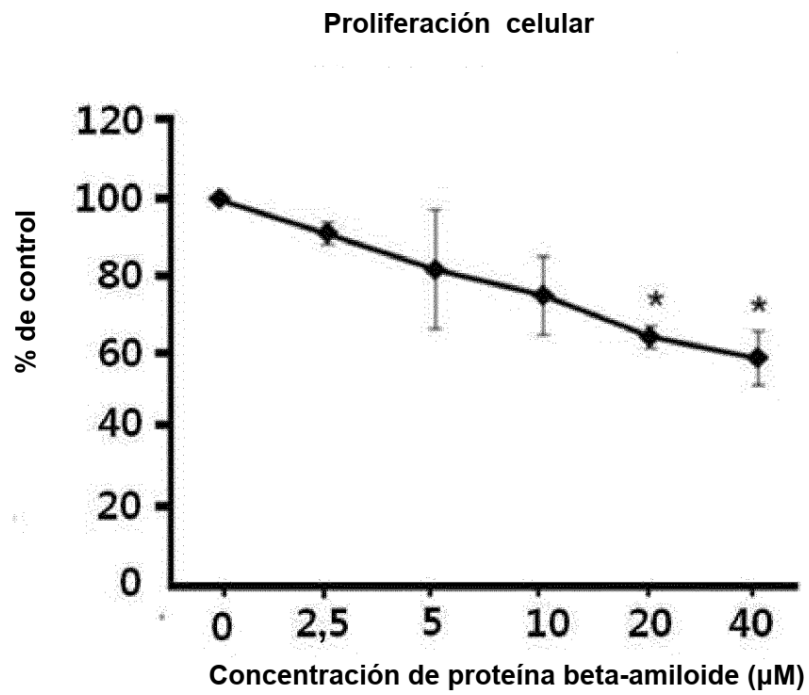


FIG.6

FIG.7

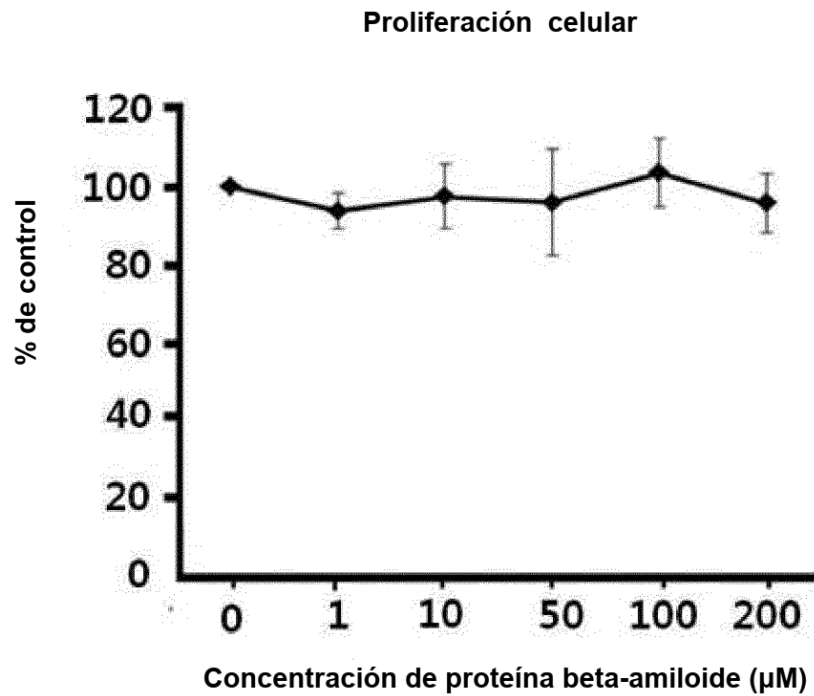


FIG.8

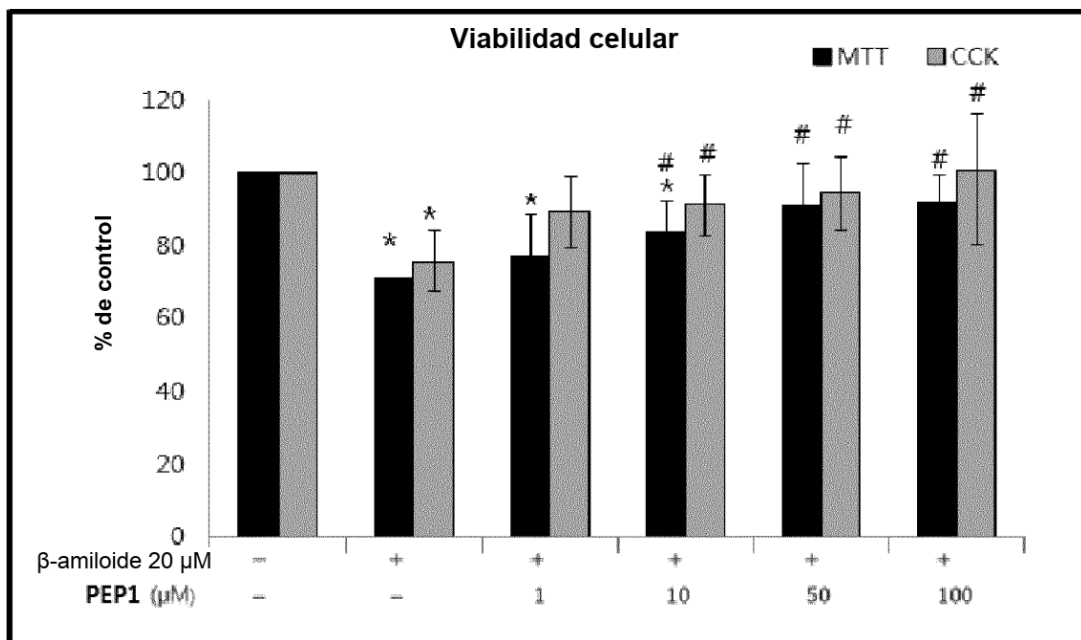


FIG.9

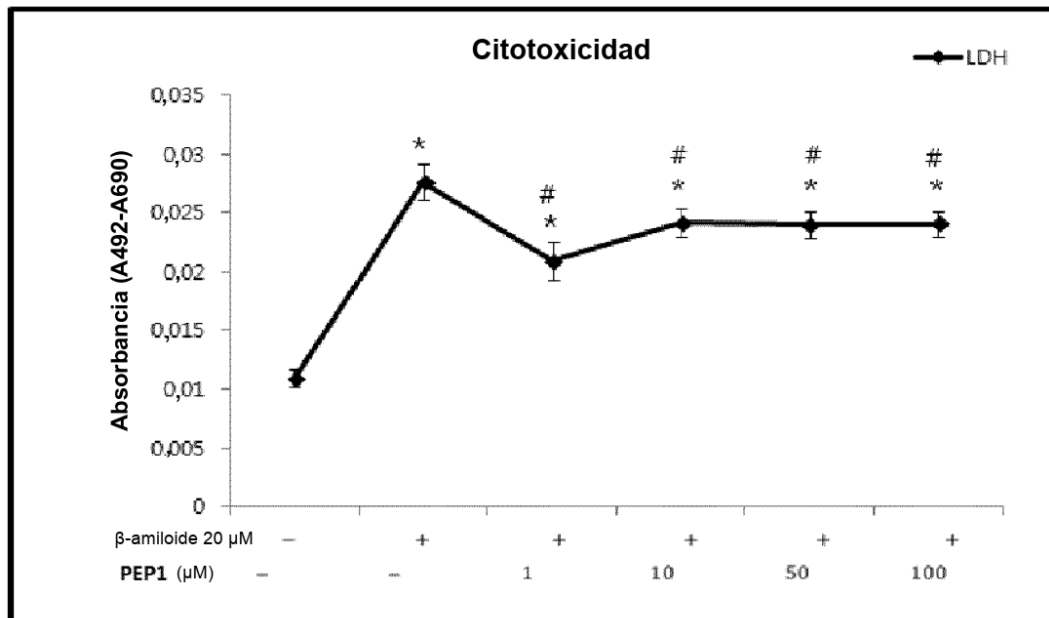


FIG.10

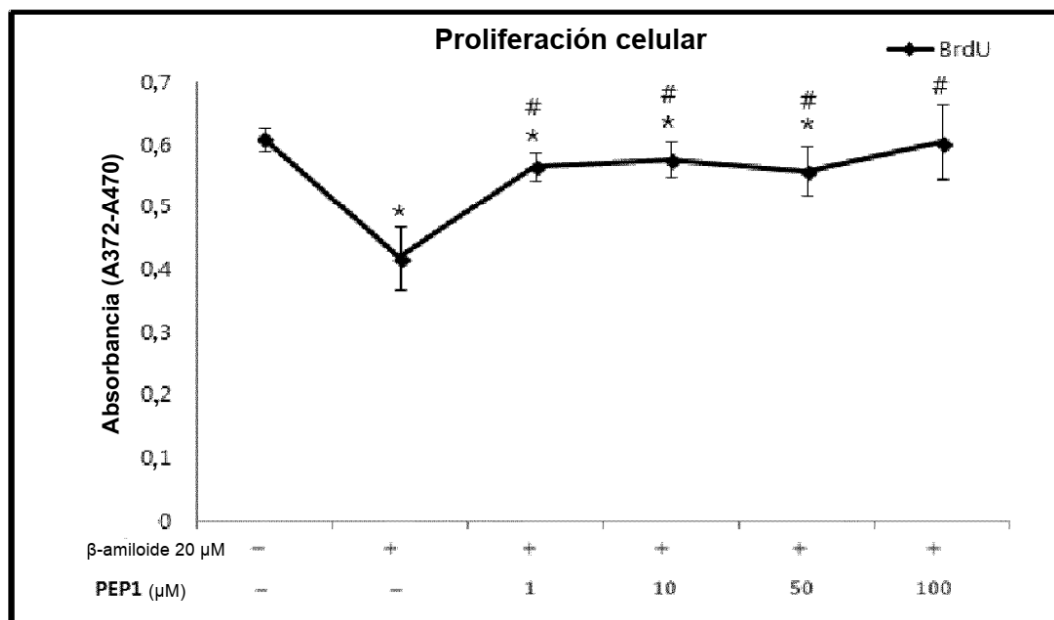


FIG.11

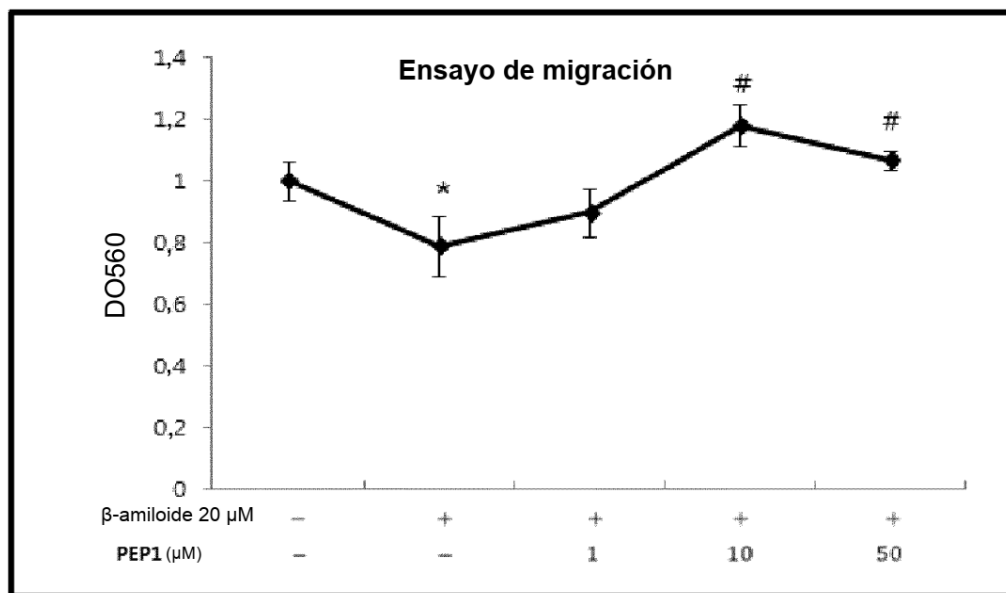


FIG.12

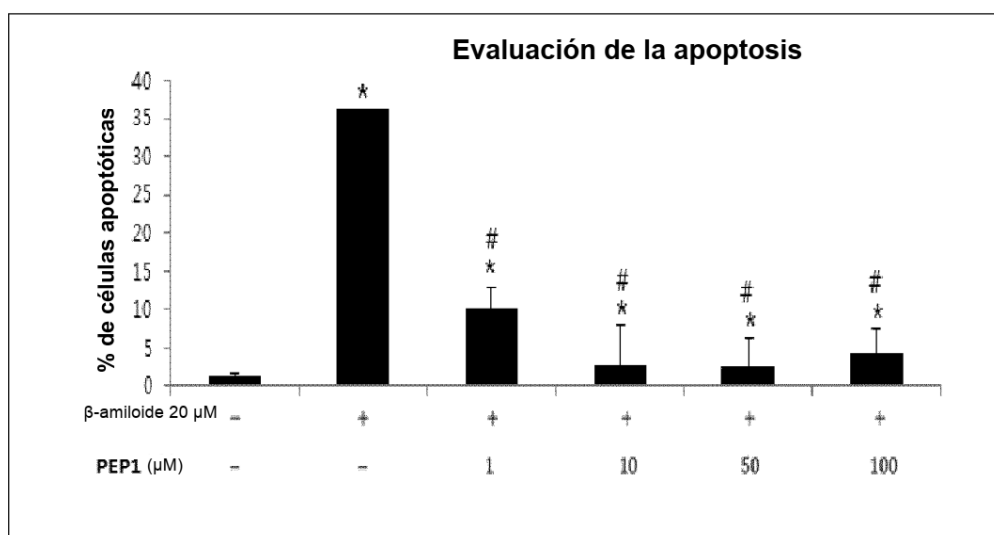


FIG.13

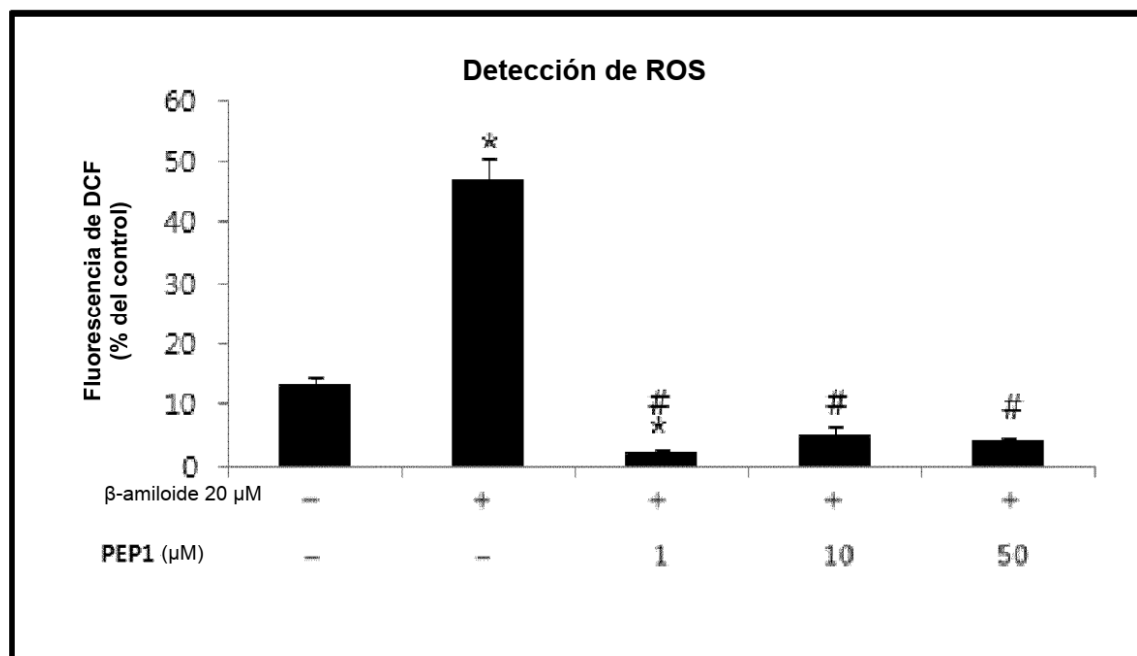


FIG.14

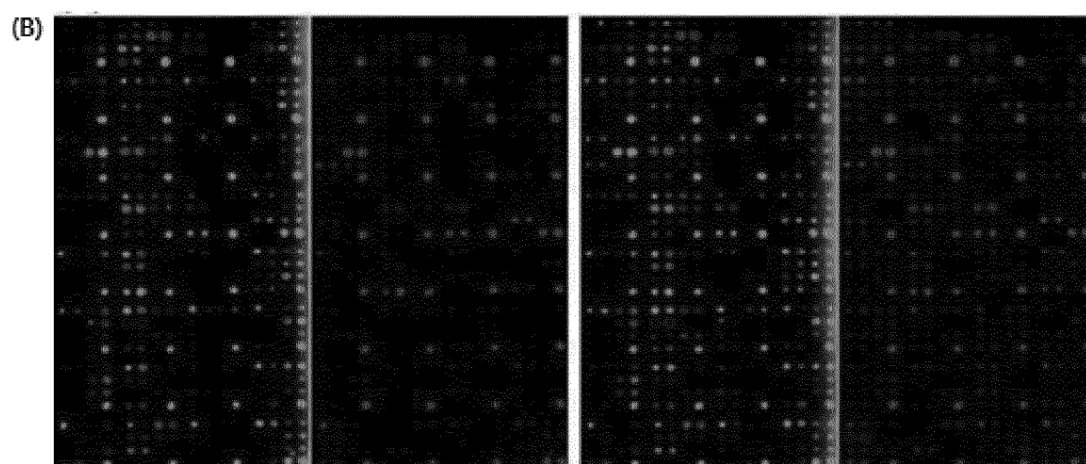
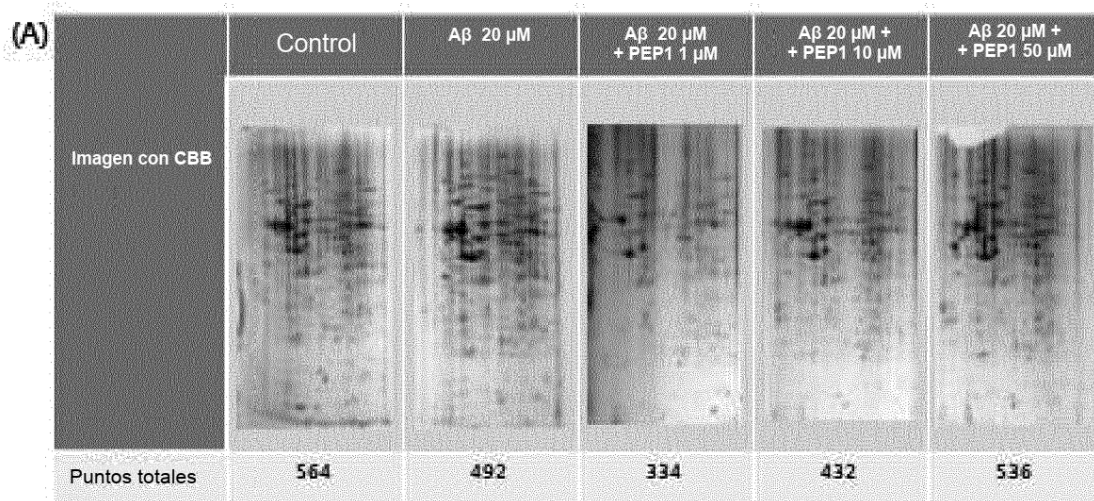
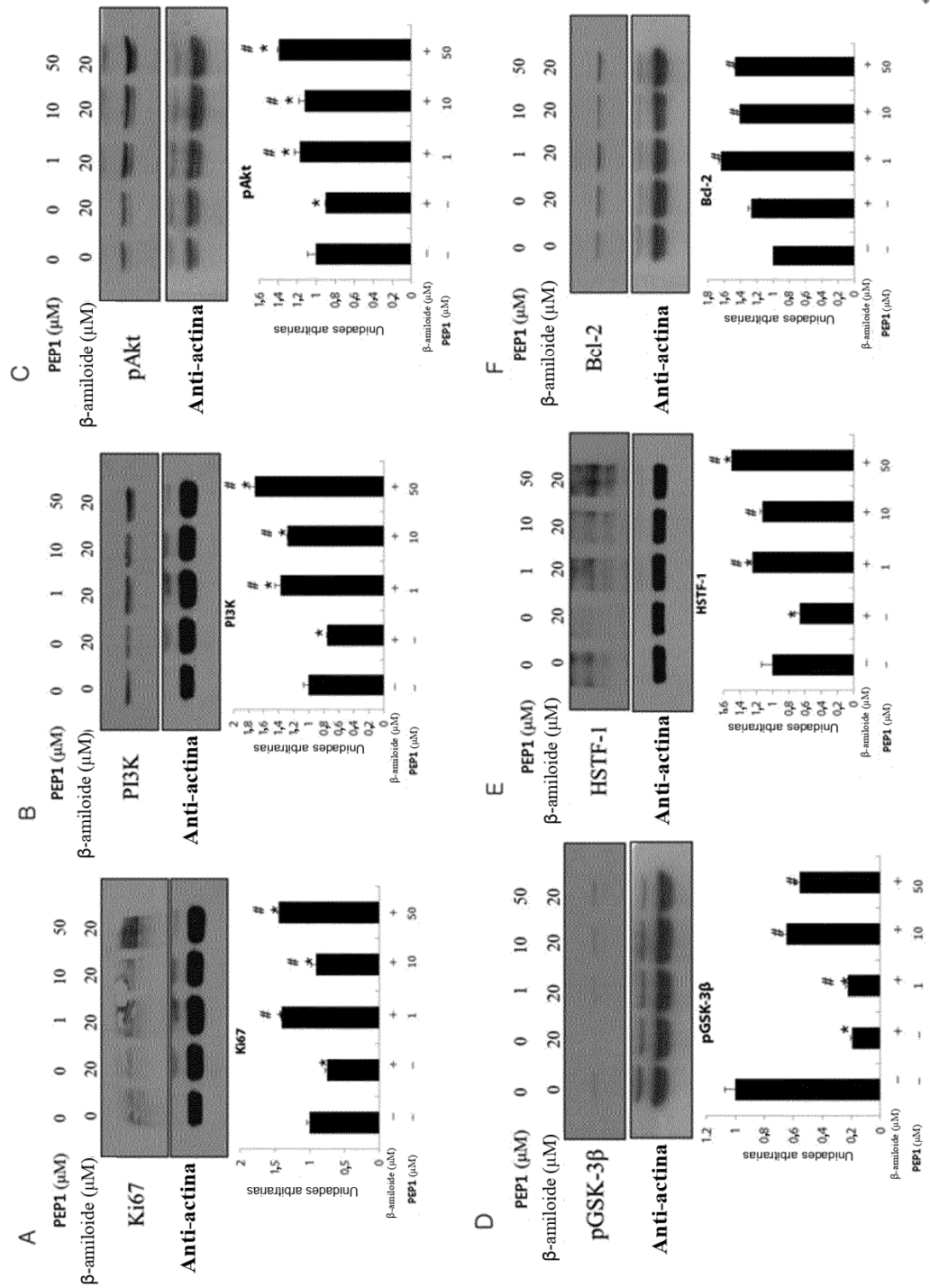


FIG.15



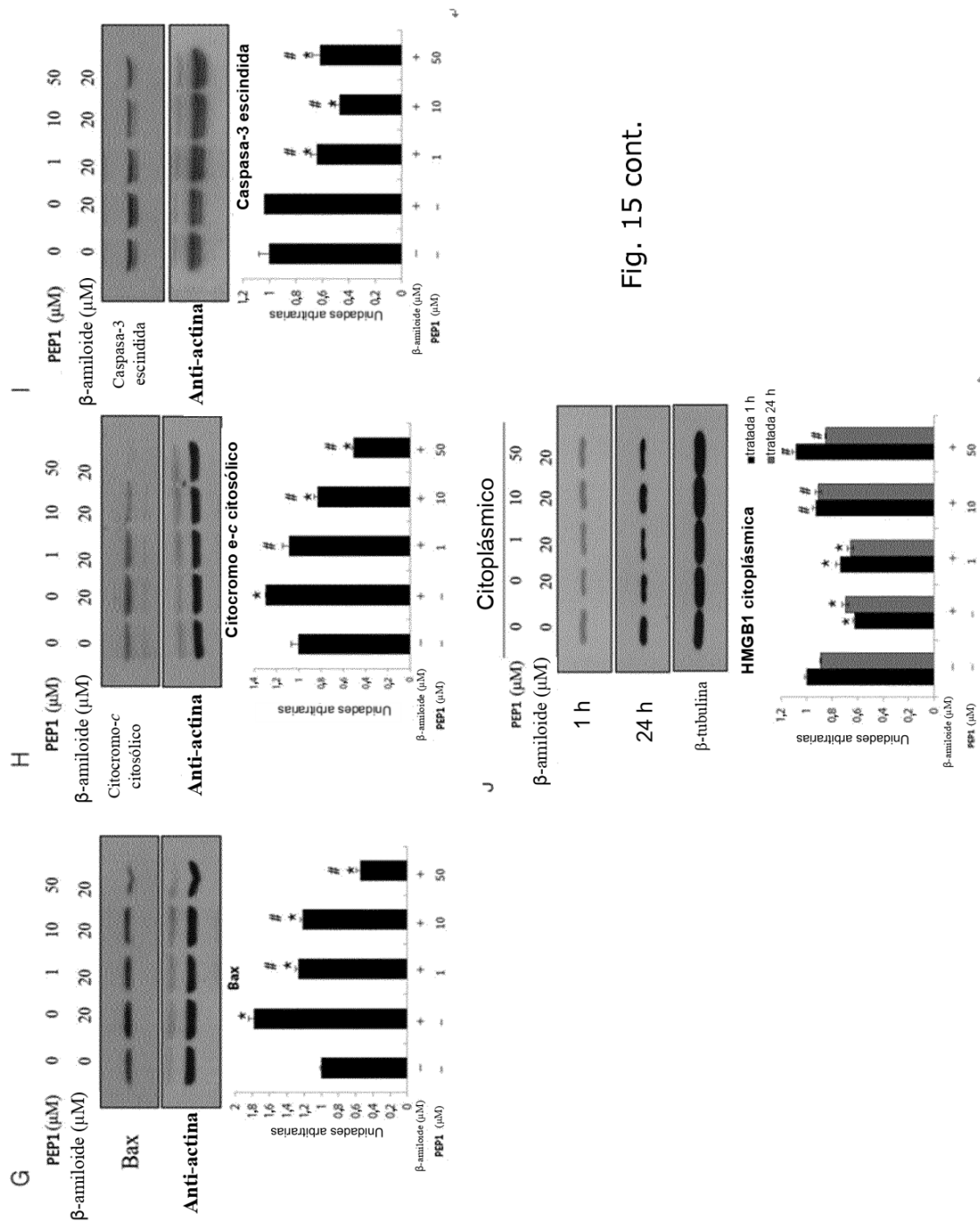


Fig. 15 cont.

FIG.16

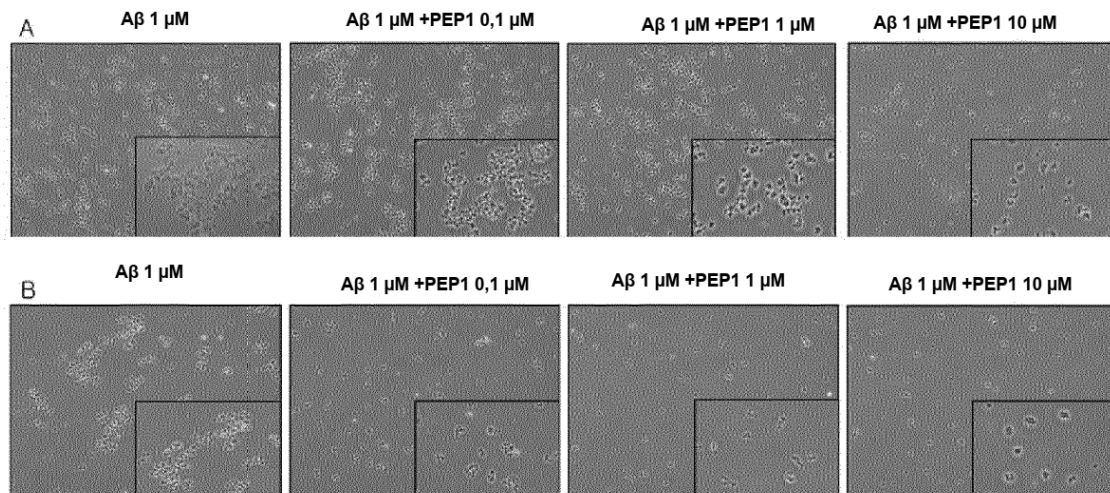


FIG. 17

