

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 749**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2015 PCT/EP2015/079395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16192819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2015 E 15885769 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.09.2019 EP 3229827**

54 Título: **Péptidos modificados y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas**

30 Prioridad:

12.12.2014 US 201462091379 P

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

12.05.2020

73 Titular/es:

**CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE (50.0%)
3, Rue Michel-Ange
75794 Paris, FR y
IMMUPHARMA FRANCE SA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MULLER, SYLVIANE;
ZIMMER, ROBERT H. y
BRIAND, JEAN-PAUL**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 759 749 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 modificados y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas

Antecedentes

1. Campo del descubrimiento.

5 La presente divulgación se refiere a péptidos modificados, y su uso para el tratamiento de enfermedades inmunitarias, incluyendo enfermedades autoinmunitarias y trastornos autoinmunes relacionados con la autofagia.

2. Información de los antecedentes.

10 En la autoinmunidad, el sistema inmunitario del paciente se activa contra los componentes del propio cuerpo. Las enfermedades autoinmunitarias no se consideran enfermedades huérfanas. En general incluso no se consideran como raras ya que como un todo afectan a millones de personas por todo el mundo. Como resultado de la influencia genética, que es principalmente poligénica, o los factores ambientales y metabólicos, hay cierto desequilibrio con respecto a su incidencia o severidad en algunas partes del mundo y en grupos particulares de personas. De acuerdo con la Asociación de Enfermedades Autoinmunitarias Relacionadas, las enfermedades autoinmunitarias afectan hasta 50 millones de americanos. Existe un dimorfismo sexual entre las enfermedades inmunitarias con un desequilibrio bien establecido hacia la población femenina. La prevalencia total acumulada de todas las enfermedades autoinmunitarias es alrededor del 5 % con un 3 % aproximadamente de hombres y un 7 % de mujeres (Hayter y Cook, 2012). Esta desviación femenina se produce en el 59 % de las enfermedades autoinmunitarias, probablemente en relación con una influencia hormonal y genes que codifican el cromosoma X. En general, la aparición de enfermedades autoinmunitarias se produce en personas jóvenes (en un grupo de edad de 20-29 años). Se ha estimado que las enfermedades autoinmunitarias están entre las diez causas principales de muerte entre las mujeres en todos los grupos de edad hasta de 65 años.

25 Bajo el término enfermedades autoinmunitarias, hay más de ochenta enfermedades causadas por autoinmunidad, incluyendo, por ejemplo, la enfermedad de Crohn/CD; cirrosis biliar primaria, miastenia gravis, púrpura trombocitopénica inmunitaria, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico neuropsiquiátrico, miastenia gravis ocular, artritis psoriásica. También, algunos individuos pueden tener más de un trastorno autoinmunitario al mismo tiempo, lo que complica la tarea del seguimiento y tratamiento, y hace cada caso único. Sin embargo, no se conoce prevención para la mayoría de los trastornos autoinmunitarios, y en general no hay tratamiento específico.

30 Se reconocen un gran número de enfermedades autoinmunitarias. Se caracterizan como "específicas de órganos" cuando están restringidas a ciertos órganos tales como el tiroides (por ejemplo, la enfermedad de Graves, tiroiditis autoinmunitaria, enfermedad de Hashimoto), páncreas (por ejemplo, diabetes tipo 1 en la que las células beta productoras de insulina se destruyen) y los músculos (miastenia gravis) o implican un tejido en particular en diferentes lugares (por ejemplo, enfermedad de Goodpasture, que afecta la membrana basal del pulmón y el riñón). Por el contrario, se clasifican como "sistémica" cuando implican una variedad de órganos y tejidos en todo el cuerpo. La más representativa emblemática de la gran familia de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas es el lupus eritematoso sistémico (SLE) en el que el corazón, las articulaciones, piel, pulmones, vasos sanguíneos, hígado, riñones y sistema nervioso pueden estar afectados. De hecho, entre estas dos familias descritas comúnmente, no hay una delimitación clara. Por ejemplo, la escleroderma, también conocida como esclerosis sistémica, que es una enfermedad autoinmunitaria sistémica crónica caracterizada por el endurecimiento de la piel, también afecta a los vasos sanguíneos, músculos, y órganos internos en las formas graves.

40 El descifrado de los mecanismos moleculares y celulares que dan lugar a la fractura de la tolerancia inmunitaria y la evolución hacia la enfermedad autoinmunitaria se mantiene en una vasta área de investigaciones en la comunidad científica y clínica. Hoy en día, no se puede identificar una firma universal, y las pistas carecen mucho en cuanto a las razones de su tropismo, así como sobre los elementos que desencadenan su iniciación y mantenimiento. Se conoce relativamente poco también con respecto a los eventos que gobiernan los sucesivos periodos de brotes y remisiones que se producen en ciertas enfermedades autoinmunitarias tales como el SLE.

50 La naturaleza multifactorial y polimórfica de la mayoría de las enfermedades autoinmunitarias complica drásticamente su diagnóstico y el tratamiento que se puede aplicar para mitigar los síntomas. Excepto en muchos casos raros, los tratamientos son sobre todo paliativos y no se dirigen a la causa de la enfermedad. Aunque se han hecho inmensos progresos a lo largo de las últimas décadas dando lugar a tasas de supervivencia de los pacientes que han aumentado considerablemente, las soluciones terapéuticas innovadoras aún están esperando que se combinen su eficacia, selectividad - y por tanto con menos efectos secundarios - y fiabilidad. Sin un tratamiento adaptado, la calidad de vida puede ser relativamente pobre para los pacientes autoinmunitarios y disminuye según evoluciona la enfermedad (fatiga, dolor, fiebre asociados a síntomas específicos). Lamentablemente, las medicaciones necesarias para minimizar los síntomas y retrasar el síndrome inflamatorio (es decir, corticosteroides, fármacos inmunosupresores y bloqueantes del factor de necrosis tumoral (TNF- α) que se utilizan durante largos periodos) inducen una alteración del sistema inmunitario completo que da lugar a hemorragia intestinal, fallo renal, aumento de la presión sanguínea, insomnio, depresión, psicosis, osteoporosis, pérdida muscular, y diabetes, sin hacer mención de los aplastantes episodios de infección repetitivos y desarrollo del cáncer. En ciertas enfermedades autoinmunitarias tales como los

que afectan al sistema nervioso central, o el síndrome antifosfolípido que se puede asociar con el SLE, las soluciones terapéuticas pueden ser limitadas, no son específicas, y lamentablemente a veces es ineficaz (Carrithers, 2014; Hanly, 2014; Inglese y Petracca, 2014; Jeltsch-David y Muller, 2014). Se está llevando a cabo una investigación intensa para desarrollar nuevas estrategias inmunomoduladoras basadas en dianas moleculares que se engranan en procesos autoinmunitarios y se pueden reorientarse específicamente. En este contexto, es central un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares y celulares que subyacen en las respuestas autoinmunitarias y más particularmente la homeostasis y regulación de células autoinmunitarias.

La autofagia es un proceso fisiológico que tiene un papel pivotante para la supervivencia, diferenciación, desarrollo y homeostasis celular. Los procesos de autofagia selectiva o no, canónica o no canónica se consideran más complejos que lo que se pensaba originalmente. Dependiendo de las condiciones celulares favorable o no favorables, la maquinaria de autofagia promoverá tanto la supervivencia como la muerte celular, manteniendo así un equilibrio decisivo entre la fabricación de componentes celulares y la rotura de los orgánulos dañados o superfluos y otros constituyentes celulares, por ejemplo. La autofagia presenta enlaces entrelazados complejos y que aún se debaten con varias rutas degradadoras, tales como la apoptosis y sistemas mediados por proteasomas y apoptosis. Entre sus muchas funciones reguladoras que se han probado experimentalmente o que se han anticipado, la autofagia controla decisivamente la inmunidad e inflamación, y cualquier señalización de autofagia alterada puede potencialmente dar lugar a enfermedades relacionadas con autoinmunidad.

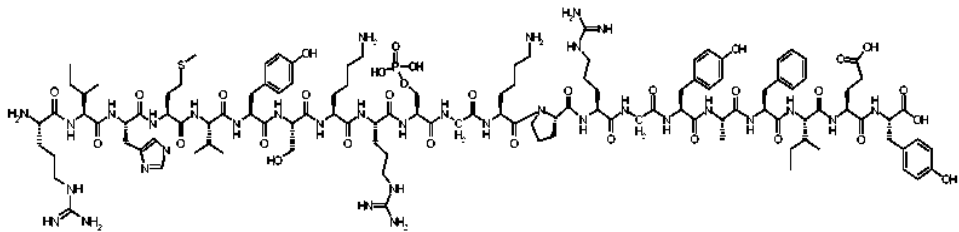
Por lo tanto, existe en la técnica una necesidad acuciante de intervenciones terapéuticas para tratar y prevenir las enfermedades autoinmunitarias. En particular, existe la necesidad de intervenciones terapéuticas que se dirijan a procesos clave implicados en el inicio y persistencia de enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, el proceso autofágico, que está implicado en el establecimiento y mantenimiento de la tolerancia inmunitaria y la eficacia apropiada del sistema inmunitario, que tiene particular importancia en la autoinmunidad. En consecuencia, existe la necesidad de proporcionar intervenciones terapéuticas capaces de modular ventajosamente los procesos autofágicos como un medio de tratamiento, prevención y/o mejora de los síntomas de los trastornos autoinmunitarios.

Sumario

La presente descripción proporciona composiciones terapéuticas y procedimientos de uso de las mismas que se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que péptidos modificados químicamente como los que se describen en el presente documento son potentes moduladores de la autofagia, en particular la CMA excesiva o aumentada. Los péptidos modificados químicamente como se describe en el presente documento se derivan de la proteína empalmosómica U1-70K. Los péptidos descritos y las composiciones que comprenden cantidades eficaces de los mismos son eficaces para tratar, prevenir y/o mejorar los síntomas de enfermedades caracterizadas por un aumento del flujo de autofagia; es decir, trastornos autoinmunitarios relacionados con la hiper autofagia tales como los trastornos relacionados con la hiper-CMA. En consecuencia, en ciertos aspectos adicionales, la divulgación proporciona procedimientos para producir y utilizar los péptidos descritos y las composiciones que comprenden los mismos para el tratamiento, prevención y/o mejora de los síntomas de enfermedades caracterizadas por un aumento del flujo de autofagia, por ejemplo, CMA. Sin estar ligados por teoría particular alguna, se ha hecho la hipótesis de que las composiciones descritas reducen el flujo de autofagia bloqueando ciertas actividades en el lisosoma.

Por lo tanto, en un aspecto la presente descripción proporciona péptidos modificados químicamente de SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, incluyendo los derivados, análogos y formas salinas de los mismos.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido aislado que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1: RIHMVYSKRSGKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 1], o



o una sal del mismo, que tenga al menos una modificación postraduccional seleccionada de entre el grupo que consiste en la fosforilación de un resto de serina, la oxidación de un resto de metionina, y la acetilación de un resto de lisina, y combinaciones de las mismas. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10 (es decir, "péptidos P140"). En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende

una fosfoserina en la posición 10, y un resto de metionina oxidado en la posición 4.

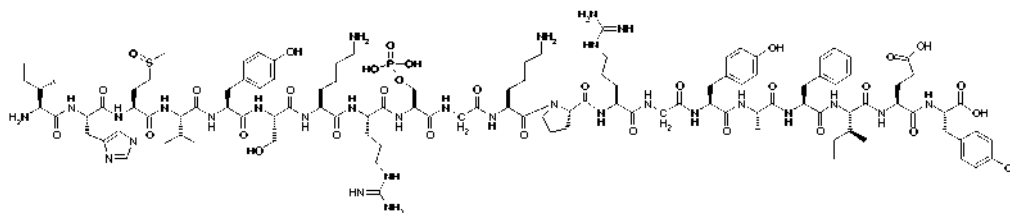
En ciertas realizaciones adicionales, el péptido de SEQ ID NO: 1 también comprende un resto de lisina acetilado. En particular dicho péptido de SEQ ID NO: 1 comprende una fosfoserina en la posición 10, y un resto de metionina oxidado en la posición 4, y una acetilación de una o ambas lisinas de la posición 8 y 12, y más particularmente comprende adicionalmente una fosfoserina en la posición 7.

5

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente, o una sal del mismo, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos: IHMVYSKRSGKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 2],

en la que la Serina (S) de la posición 9 está fosforilada, y la Metionina (M) de la posición 3 está oxidada.

10 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido del compuesto I que tiene la siguiente fórmula:



El compuesto I también se puede representar por:

IHM(O)VYSKRS(PO₃H₂)GKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 5]

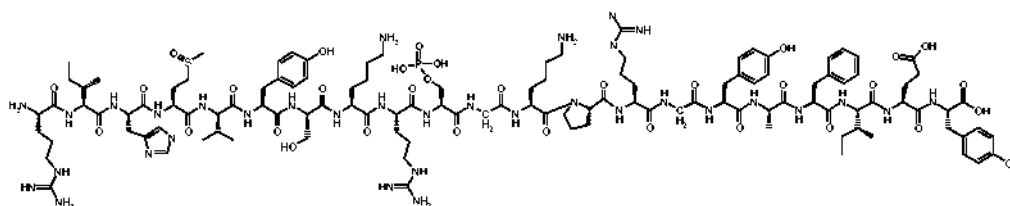
en la que "M(O)" representa la metionina oxidada, y "S(PO₃H₂)" representa la fosfoserina.

15 Estos péptidos se derivan de la proteína U1 snRNP de 70 kDa humana (SEQ ID NO: 3), y se corresponden con la región delimitada por el segmento de aminoácidos que se extiende desde el resto 132 al resto 151 de la SEQ ID NO: 3. Formalmente, el resto que está fosforilado se corresponde con el aminoácido de la posición 140 desde la primera metionina de la SEQ ID NO: 3, y el resto que está oxidado se corresponde con el aminoácido de la posición 134 desde la primera metionina de la SEQ ID NO: 3.

20 En aspectos adicionales, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una sal del mismo, que tenga al menos una modificación postraduccional seleccionada de entre el grupo que consiste en la fosforilación de un resto de serina, la oxidación de un resto de metionina, y la acetilación de un resto de lisina, y combinaciones de las mismas. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido

25 (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 9, y un resto de metionina oxidado en la posición 3. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido de SEQ ID NO: 2 también comprende un resto de lisina acetilado.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido del compuesto II que tiene la siguiente fórmula:



30

El compuesto II también se puede representar por:

RIHM(O)VYSKRS(PO₃H₂)GKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 4]

en la que M(O) representa la oxidación de la metionina, y S(PO₃H₂) representa la fosforilación de la serina.

35 Por lo tanto, la descripción proporciona péptidos, o una sal de los mismos, que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos escogida de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

En una realización adicional, la descripción proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un péptido, o una sal del mismo, seleccionado de entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada en la posición 4; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10, y una combinación de los mismos.

40

En otro aspecto, la presente descripción, proporciona composiciones que comprenden una cantidad eficaz de uno o más de los péptidos descritos en el presente documento, y un excipiente o vehículo.

En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para el tratamiento, prevención o mejora de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria, por ejemplo, un enfermedad o trastorno del sistema inmunitario relacionados con la autofagia o una enfermedad autoinmunitaria relacionada con la hiper-CMA, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición terapéutica como se describe en el presente documento a un sujeto que lo necesite, en el que la composición es eficaz para el tratamiento, prevención y/o mejora de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno.

En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno se selecciona de entre el grupo que consiste en una enfermedad o trastorno relacionados con la autofagia excesiva o aumentada, por ejemplo, la CMA, artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), miopatías, distrofia muscular (MD), enfermedad de Crohn (CD), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibromialgia, polimiositis, enfermedad pulmonar, trombocitopenia inmunitaria crónica (ITP), lupus neuropsiquiátrico, síndrome de Gougerot-Sjögren, artritis reumatoide, enfermedad de Guillain-Barré (crónica/CIDP), asma (aguda o crónica), inflamación eosinofílica de vías aéreas, síndrome de colon irritable (IBS o IBD), polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), diabetes tipo II, regeneración de tejido graso, escleroderma, psoriasis, enfermedad de Alzheimer o Parkinson.

En ciertos aspectos adicionales, la descripción proporciona composiciones terapéuticas que comprenden una cantidad eficaz de al menos un péptido como se describe en el presente documento, y al menos un agente bioactivo adicional, por ejemplo, un agente inmunomodulador, por ejemplo, un agente capaz de la inhibición o reducción del flujo de autofagia. En ciertas realizaciones, la composición comprende adicionalmente un excipiente o vehículo como se describe en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Representación esquemática de las rutas autofágicas. (A) Los tres ejes principales de autofagia, macroautofagia, microautofagia y CMA. El proceso de macroautofagia se inicia con la formación de la denominada membrana de aislamiento. Esta última se alarga para englobar materiales citosólicos, formando una estructura característica de doble membrana denominada autofagosoma. Este último se fusiona a continuación con un lisosoma para convertirse en un autolisosoma, tras lo cual el material englobado se degrada. Las rutas moleculares que regulan la autofagia están altamente conservadas desde las levaduras hasta las células eucariotas superiores. En la CMA, las proteínas que llevan la secuencia de señal tipo pentapéptido KFERQ son reconocidas por la chaperona HSPA8, que se asocia entonces con LAMP-2A, desencadenando su oligomerización. Este evento permite que la proteína direccionada se transloque dentro de la luz del lisosoma mediante un proceso que necesita a la HSPA8. La microautofagia implica el secuestro directo de componentes celulares por el lisosoma mediante invaginación de las membranas lisosómicas; (B) Etapas principales del proceso macroautofágico; (C) La autofagia como fuente principal de péptidos para la presentación por las moléculas del MHC II a los linfocitos T. Abreviaturas: CMA, autofagia mediada por chaperona; ER, retículo endoplásmico; HLA, antígeno leucocitario humano; HSPA8/HSC70, proteína equivalente de choque térmico de 70 kDa; LAMP-2A, proteína-2A de membrana asociada al lisosoma; MHC, compartimento del complejo mayor de histocompatibilidad clase II; MHC II, complejo mayor de histocompatibilidad clase II; TCR, receptor de linfocito T.

Figura 2. Reguladores farmacológicos de la autofagia. Un diagrama que ilustra los posibles sitios de intervención de los reguladores farmacológicos de autofagia. De izquierda a derecha: la rapamicina y la dexametasona inhiben la actividad cinasa de mTOR, dando lugar a la regulación positiva de la microautofagia. La dexametasona también se conoce por que actúa sobre la estructura pre-autofagosómica. La trehalosa, cuya diana aún se debate, es un activador de la autofagia mediante una ruta independiente de mTOR. La Baflomicina A1 evita la maduración de las vacuolas autofágicas inhibiendo la fusión entre los autofagosomas y los lisosomas. Actúa inhibiendo la ATPasa H⁺ vacuolar. Péptido P140 (▲), se ha demostrado la captación en los linfocitos B mediante endocitosis mediada por clatrina y el asentamiento en los lisosomas después de la administración a ratones, y DSG, interactuando ambos con la HSPA8 *in vitro* y alternado el pH intralisosómico. El P140 provoca la acumulación de marcadores de autofagia p62/secuestrosoma 1 y MAP1LC3-II en los linfocitos B MRL/lpr, lo que concuerda con una regulación negativa del flujo autofágico. Este péptido afecta tanto a la CMA como a la macroautofagia. CQ y HCQ son agentes lisosomotropos que evitan la acidificación endosómica. Se acumulan dentro de los endosomas y lisosomas, dando lugar a la inhibición de las enzimas lisosómicas, que necesitan un pH ácido, la fusión defectuosa de los endosomas y lisosomas y la maduración de los autolisosomas. Abreviaturas: CMA, autofagia mediada por chaperonas; CQ, cloroquina; DSG, 15-desoxiespergualina; HCQ, hidroxicloroquina; HSPA8, proteína 8 de choque térmico; LAMP-2A, proteína-2A de membrana asociada al lisosoma; MAP1LC3, proteína 3 de cadena ligera asociada al microtúbulo; mTOR, diana de rapamicina en mamíferos.

Figura 3. Demuestra la estabilidad a 37 °C del péptido de acuerdo con la invención (Compuesto II) en comparación con la estabilidad del péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada. El gráfico representa el porcentaje de estabilidad a lo largo del tiempo (expresado en días). Las curvas A-C representan la estabilidad del Compuesto II a una concentración de 200, 100 y 50 µg/ml, respectivamente. Las curvas D-F representan la estabilidad del péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada a una concentración de 200, 100 y 50 µg/ml, respectivamente.

Figura 4. Gráfico de Kaplan-Meier que representa la tasa de supervivencia acumulada (en porcentaje) a lo largo

del tiempo (expresado en semanas) de los ratones inyectados con NaCl (línea con círculos), el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada (línea con cuadrados) y el compuesto II de acuerdo con la invención (líneas con triángulos).

Figura 5. Puntuación de proteinuria a lo largo del tiempo (expresado en semanas) de los ratones inyectados con NaCl (línea con círculos), el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada (línea con cuadrados) y el compuesto II de acuerdo con la invención (líneas con triángulos).

Figura 6. Medición de la hiperplasia de las células MRL/lpr de los ratones. El eje Y representa el número de células/ml de sangre ($\times 10^6$), en los ratones tratados con NaCl (círculos), el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada (cuadrados) y el compuesto II de acuerdo con la invención (triángulos).

Figura 7. Medición de la afinidad por la proteína HSC70 del péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada. Las curvas se corresponden con la respuesta Biacore a lo largo del tiempo (expresado en segundos) utilizando el péptido que consiste en la SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada a una concentración de 25 μM (A), 12,5 μM (B), 6,25 μM (C), 3,12 μM (D) y 1,56 μM (E).

Figura 8. Medida de la afinidad del compuesto II de acuerdo con la invención, por la proteína HSC70. Las curvas se corresponden con la respuesta Biacore a lo largo del tiempo (expresado en segundos) utilizando el compuesto II a una concentración de 25 μM (A), 12,5 μM (B), 6,25 μM (C), 3,12 μM (D) y 1,56 μM (E).

Figura 9. Proliferación de esplenocitos T CD4⁺ en presencia de 100 μg de CII/ml en los cultivos.

Figura 10. Captación celular del péptido P140 fluorescente en manitol al 5,4 % o trehalosa al 10 % en los linfocitos B MRL/lpr y células Raji según se visualiza mediante citometría de flujo. Los linfocitos B provenían de ratones MRL/lpr de 12-14 semanas de edad (células primarias); las células Raji son una línea celular establecida derivada en 1963 de linfocitos B de un paciente con linfoma de Burkitt. Hay mucha menos captación de P140 tanto en linfocitos B MRL/lpr y células Raji cuando el péptido se diluye en trehalosa que en manitol.

Figura 11. Imágenes confocales de los linfocitos B de la Figura 10. Todas las imágenes confocales se tomaron con los mismos ajustes del microscopio. Rab9 (en rojo) identifica el último compartimento endosómico donde se localiza el P140 antes del asentamiento en los lisosomas. DAPI (en azul) identifica el ADN. Los resultados confirman los resultados de la citometría de flujo que cuando está en trehalosa, entra mucho menos péptido P140 (en verde) en los linfocitos B.

Figura 12. El efecto antiinflamatorio de un fosfopéptido P140 se evaluó cuando se administraba localmente (por vía intranasal) o sistémicamente (por vía intravenosa) en un modelo de 15 días de inflamación hipereosinofílica de vías aéreas en ratones. En resumen, se sensibilizaron los ratones Balb/c machos de nueve semanas de edad mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de una mezcla que contenía 50 μg de OVA y 2 mg de aluminio en 0,1 ml de solución salina. Los ratones se desafiaron mediante administración i.n. De 25 μl de OVA el día 5, luego 25 μl de OVA y/o solución salina el día 12, 13 y 14. Los ratones se trataron mediante inyección i.v. (2 ml/kg) o administración i.n. (1 ml/kg) de P140 o el disolvente el día 9.

Figura 13. Efecto del fosfopéptido P140 sobre el reclutamiento de células inflamatorias en las vías aéreas en un modelo de hipereosinofilia de vías aéreas inducida por ovoalbúmina en ratones Balb/c. Los ratones Balb/c se inmunizaron contra la OVA (días 0, 1 y 2) y se desafiaron con OVA (el día 5) y OVA o solución salina (los días 12, 13 y 14). El P140 se administró por vía i.n. (P140-IN) o i.v. (P140-IV) a la dosis de 4 mg/kg el día 9. Se muestran el número absoluto de A) eosinófilos, B) neutrófilos, C) macrófagos, D) linfocitos T, y E) linfocitos B en el BAL. Los bloques son las medias y las barras los valores de SEM (n = 1 o 6 por grupo). #### p \leq 0,001 vs grupo de control y * p \leq 0,05, ** p \leq 0,01 y *** p \leq 0,001 vs el grupo de OVA.

Figura 14. Se sensibilizaron ratones Balb/c machos de nueve semanas de edad mediante administración intranasal (i.n.) de extracto de HDM (Stallergenes): 1 μg en 25 μl de solución salina los días 0, 1, 2, 3, 4, y 10 μg los días 14 y 21. Los ratones se desafiaron mediante administración i.n. de HDM (1 μg) y/o solución salina los días 28, 29 y 30. Los ratones se trataron mediante inyección i.v. (2 ml/kg) de P140 o el disolvente el día 25.

Figura 15. Efecto del fosfopéptido P140 sobre la reactividad de las vías aéreas en un modelo de asma inducida por HDM en ratones Balb/c. La resistencia de la vía aérea R que se expresa como cm de H₂O.s.ml⁻¹, la elasticidad E que se expresa como cm de H₂O.ml⁻¹ y la distensibilidad C que se expresa como ml.cm de H₂⁻¹ en la línea basal y en respuesta a PBS y MCh (50 mg/ml) en aerosol se evaluaron con Flexivent®. Los bloques son las medias y las barras los valores de SEM (n = 5 a 8 por grupo). #### p \leq 0,001 entre la nebulización de PBS y MCh, y * p \leq 0,05 entre el P140 y los grupos de disolvente en el asma crónica.

Figura 16. Efecto del fosfopéptido P140 sobre el reclutamiento de células inflamatorias en las vías aéreas en un modelo de asma inducida por HDM en ratones Balb/c. Se sensibilizaron ratones Balb/c mediante administración intranasal (i.n.) de HDM (Stallergenes): 1 μg en 25 μl de PBS los días 0, 1, 2, 3, 4, y 10 μg los días 14 y 21. Los ratones se desafiaron mediante administración i.n. de HDM y/o PBS los días 28, 29 y 30. Los ratones se trataron mediante inyección i.v. (2 ml/kg) de P140 a la dosis de 4 mg/kg o el disolvente el día 25. Se muestra el número absoluto de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, macrófagos y CD en BAL. Los bloques son las medias y las barras los valores de SEM (n = 5 a 8 por grupo). # p $<$ 0,05 y #### p \leq 0,001 entre el grupo de disolvente en el asma crónica y desafío con alérgeno, y * p \leq 0,05 entre el P140 y los grupos de disolvente en el asma crónica.

Figura 17. Peso corporal (A) y curso clínico (B) de ratas CIDP tratadas con el péptido P140 (●) en comparación con las ratas sin tratar (□). La inyección del péptido P140 se representa mediante flechas rojas. Se indican los valores de la media y del SEM.

Figura 18. Evaluación de las subpoblaciones de linfocitos en glándulas salivares aisladas.

Figura 19. Evaluación del nivel de inflamación en glándulas salivares aisladas.

Figura 20. Evaluación del número de FS en glándulas salivares aisladas.

Figura 21. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 22. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 23. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 24. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

5 **Figura 25.** Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 26. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 27. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 28. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 29. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

10 **Figura 30.** Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 31. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 32. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

Figura 33. Evolución diaria del tamaño de extremidades delanteras derechas, P140 vs. NaCl (ensayo T no pareado).

15 **Figura 34.** Evolución diaria del tamaño de extremidades delanteras izquierdas, P140 vs. NaCl (ensayo T no pareado).

Figura 35. Evolución de la puntuación de inflamación durante una noche, P140/NaCl vs. Lupuzor™.

Descripción detallada

20 A menos de que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que entiende un experto en la técnica a la que la presente invención pertenece. La terminología que se utiliza en la descripción solamente es para la descripción de realizaciones particulares y no pretende ser limitante de la invención.

25 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor que interviene, hasta la décima de la unidad del límite más bajo a menos de que el contexto dicte claramente otra cosa, entre el límite superior e inferior de ese intervalo establecido está englobado dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños que se puedan incluir independientemente en los intervalos más pequeños, también se engloban dentro de la invención, salvo cualquier límite específicamente excluido del intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera de ambos de estos límites incluidos también se incluyen en la invención.

30 Como se utiliza en el presente documento, los siguientes términos pueden tener los significados adscritos a ellos posteriormente, a menos de que se especifique otra cosa. Sin embargo, se debería entender que también son posibles otros significados que sean conocidos o entendidos por los expertos habituales en la técnica a la que la invención pertenece.

35 Se debe señalar que como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de "un", "una" y "el" incluyen las referencias en plural (es decir, se refieren a uno o a más de uno o al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

40 El término "aproximadamente" como se utiliza en el presente documento, en asociación con valores o intervalos numéricos, refleja el hecho de que hay un cierto nivel de variación que se reconoce y se tolera en la técnica debido a las limitaciones prácticas y/o teóricas. Por ejemplo, se tolera una variación menor debido a las variaciones inherentes de la manera en que ciertos dispositivos operan y/o se toman las mediciones. De acuerdo con lo anterior, la palabra "aproximadamente" normalmente se utiliza para englobar valores dentro de la desviación típica o el error típico.

45 La expresión "y/o" como se utiliza en el presente documento en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones, se debería entender que significa "uno o ambos" de los elementos así conjuntados, es decir, elementos que están presentes conjuntamente en algunos casos y disyuntivamente presentes en otros casos. Los múltiples elementos enumerados con "y/o" se deberían considerar de la misma manera, es decir, "uno o más" de los elementos así conjuntados. Opcionalmente pueden estar presentes otros elementos diferentes de los identificados específicamente en la oración con "y/o", sea relacionados o no relacionados con los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, una referencia a "A y/o B", cuando se utiliza en conjunción con un lenguaje de extremos abiertos tales como "que comprende" se puede referir, en una realización, a solo A (incluyendo opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, solo a B (incluyendo opcionalmente elementos distintos de A); y en otra realización más, a ambos, A y B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

50 Como se utiliza en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, "o" se debería entender que tiene el mismo significado que "y/o" como se ha definido anteriormente. Por ejemplo, cuando se separan artículos de una lista, "o" o "y/o" se interpretarán como inclusivos, es decir, la inclusión de al menos uno, pero también incluyendo más de uno, de un número o lista de elementos, y, opcionalmente, artículos adicionales no enumerados. Solamente las expresiones que indiquen claramente lo contrario, tales como "solo uno de" o "exactamente uno de", o, cuando se utiliza en las reivindicaciones "que consiste en, se referirá a la inclusión de exactamente un elemento de un número o lista de elementos. En general, el término "o" como se utiliza en el presente documento solo se interpretará como que indica alternativas excluyentes (es decir, "uno o el otro, pero no ambos") cuando está precedido

por términos de exclusividad, tal como "cualquiera", "uno de", "solo uno de" o "exactamente uno de".

En las reivindicaciones, así como en la memoria descriptiva anterior, todas las frases transicionales tales como "que comprende", "que incluye", "que lleva", "que tiene", "que contiene", "que implica", "que mantiene", "compuesto por", y similares se tienen que entender como de extremos abiertos, es decir, para significar que incluyen pero no se limitan a. Solamente las frases transicionales "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" serán frases transicionales cerradas o semicerradas, respectivamente, como se expone en el Manual de Procedimientos de Examen de Patentes de la Oficina de Patentes de Estados Unidos, Sección 2111.03.

Como se utiliza en el presente documento en la memoria descriptiva y las reivindicaciones, la frase "al menos uno", en referencia a una lista de uno o más elementos se debería entender que significa al menos un elemento seleccionado de entre cualquiera o más de los elementos de la lista de elementos, pero no que incluye necesariamente al menos uno de todos y cada uno de los elementos enumerados específicamente dentro de la lista de elementos y no que excluye cualquiera de las combinaciones de elementos de la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos pueden estar presentes opcionalmente elementos distintos a los identificados específicamente dentro de la lista de elementos a los que se refiere la frase "al menos uno", sea relacionados o no relacionados a los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, a modo de ejemplo no limitante, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos uno de A o B" o, de manera equivalente "al menos uno de A y/o B") se puede referir, en una realización, a al menos uno, opcionalmente que incluya más de uno, A con B no presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de B); en otra realización, a al menos uno, que incluya opcionalmente más de uno, B, sin A presente (y que incluye opcionalmente elementos distintos de A); en otra realización más, a al menos uno, que incluya opcionalmente más de uno, B (y que incluye opcionalmente otros elementos); etc.

También se debería entender que, en ciertos procedimientos descritos en el presente documento que incluyen más de una etapa o acto, el orden de las etapas o actos de los procedimientos no se limita necesariamente al orden en el que se mencionan las etapas o actos del procedimiento a menos de que el contexto indique otra cosa.

Las expresiones "coadministración" y "coadministrar" o "terapia de combinación" se refieren a la administración tanto concurrente (la administración de dos o más agentes terapéuticos el mismo tiempo) y administración variable en el tiempo (la administración de uno o más agentes terapéuticos en un momento diferente de la administración de un agente o agentes terapéuticos adicionales), a condición de que los agentes terapéuticos estén presentes en el paciente hasta cierto punto, preferentemente en cantidades eficaces, al mismo tiempo. En ciertos aspectos preferidos, uno o más de los compuestos descritos en el presente documento se coadministran en combinación con al menos un agente bioactivo adicional, incluyendo especialmente un agente anticáncer. En aspectos particularmente preferidos, la coadministración de compuestos da como resultado una actividad y/o terapia sinérgicas, incluyendo una actividad anticáncer.

El término "compuesto", como se utiliza en el presente documento, a menos de que se indique de otra manera, se refiere a cualquier compuesto químico específico desvelado en el presente documento e incluye tautómeros, regioisómeros, isómeros geométricos, y donde sea aplicable, estereoisómeros, incluyendo isómeros ópticos (enantiómeros) y otros estereoisómeros (diastereómeros) de los mismos, así como sales farmacéuticamente aceptables y derivados (incluyendo la forma de profármaco) de los mismos cuando sea aplicable, en el contexto. Dentro de su uso en el contexto, el término compuesto se refiere en general a un único compuesto, pero también incluye otros compuestos tales como estereoisómeros, regioisómeros y/o isómeros ópticos (que incluyen mezclas racémicas) así como enantiómeros específicos o mezclas enriquecidas enantioméricamente de los compuestos desvelados. El término también se refiere; en el contexto de formas de profármaco de compuestos que se han modificado para facilitar la administración y suministro de los compuestos en un sitio de actividad. Se señala que, en la descripción de los compuestos presentes, se describen numerosos sustituyentes y variables asociadas con los mismos, entre otros. Se entiende por los expertos habitados en la técnica que las moléculas que se describen en el presente documento son compuestos estables como se describe en general más adelante del presente documento. Cuando se muestra el enlace, tanto un enlace doble como un enlace sencillo están representados en el contexto del compuesto mostrado.

El término "derivados" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, composiciones químicas, por ejemplo, ácidos nucleicos, nucleótidos, polipéptidos o aminoácidos, formados a partir de los compuestos nativos sea directamente, mediante modificación, o por sustitución parcial. El término "análogos" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, composiciones químicas, por ejemplo, ácidos nucleicos, nucleótidos, polipéptidos o aminoácidos que tiene una estructura similar a, pero no idéntica al compuesto nativo.

La expresión "cantidad/dosis eficaz", "cantidad/dosis farmacéuticamente eficaz", "cantidad/dosis farmacéuticamente eficaz" o "cantidad/dosis terapéuticamente eficaz" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, la cantidad/dosis del ingrediente farmacéutico activo suficiente para evitar, inhibir, la existencia, mejorar, retrasar o tratar (aliviar un síntoma hasta cierto punto, preferentemente todos) los síntomas de una afección, trastorno o estado de enfermedad. La cantidad eficaz depende del tipo de enfermedad, la composición utilizada, la vía de administración, el tipo de mamífero que se va a tratar, las características físicas del mamífero específico en consideración, la medicación concurrente, y otros factores que reconocerán los expertos en la técnica médica. En general, se administra una cantidad de entre 0,1 mg/kg y 1000 mg/kg de peso corporal/día de los principios activos dependiendo de la potencia

del agente. La toxicidad y eficacia terapéutica de dichos compuestos se puede determinar por procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, para la determinación de la DL50 (la dosis letal para el 50 % de la población) y la DE50 (la dosis terapéuticamente eficaz para el 50 % de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y terapéuticos es el índice terapéutico y se puede expresar como la relación de DL50/DE50. Se prefieren los compuestos que presentan índices terapéuticos grandes. Aunque se pueden utilizar compuestos que presentan efectos secundarios tóxicos, se debería tener cuidado en diseñar un sistema de suministro que dirija dichos compuestos al sitio del tejido afectado con el fin de minimizar el daño potencial a las células no infectadas y, de esta manera, reducir los efectos secundarios. Los datos obtenidos de los ensayos en cultivo celular y estudios en animales se pueden utilizar en la formulación de un intervalo de dosificaciones para su uso en seres humanos. La dosificación de dichos compuestos reposa preferentemente dentro de un intervalo de concentraciones circulantes que incluyen la DE50 con poca o ninguna toxicidad. La dosificación puede variar dentro de este intervalo dependiendo de la forma de dosificación que se emplee y la vía de administración que se utilice. Para cualquier compuesto que se utilizan en el procedimiento de la invención, la dosis terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente a partir de los ensayos en cultivos celulares. Una dosis se puede formular en modelos animales para conseguir un intervalo de concentración en plasma circulante que incluye la CI50 (es decir, la concentración del compuesto de ensayo que consigue una inhibición semi-máxima de los síntomas) según se determinó en el cultivo celular. Dicha información se puede utilizar para determinar con más precisión dosis útiles en seres humanos. Se pueden medir los niveles en el plasma, por ejemplo, mediante cromatografía líquida de altas prestaciones.

La expresión "composición farmacológica", "composición terapéutica", "formulación terapéutica" o "formulación farmacéuticamente aceptable" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, una composición o formulación que permite la distribución eficaz de un agente proporcionado por la invención, que esté en una forma adecuada para la administración en la localización física más adecuada para su actividad deseada, por ejemplo, la administración sistémica.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" o "farmacológicamente aceptable" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, entidades y composiciones que no produzcan un reacción adversa, alérgica o perjudicial de otra manera cuando se administra a un animal, o un ser humano, según sea apropiado.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo farmacológicamente aceptable" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto convencional de referencia en el campo. Los ejemplos preferidos de dichos vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y seroalbúmina humana al 5 %. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en la composición. También se pueden incorporar principios activos suplementarios en las composiciones.

La expresión "administración sistémica" se refiere a una vía de administración que es, por ejemplo, entérica o parenteral, y da como resultado la distribución sistémica de una agente que da lugar a la absorción sistémica o acumulación de los fármacos en la corriente sanguínea seguido por la distribución a lo largo de todo el cuerpo. Las formas adecuadas, en parte, dependen del uso o la vía de entrada, por ejemplo, oral, transdérmica, o por inyección. Dichas formas no deberían evitar que la composición o formulación alcance una célula diana (es decir, una célula a la que se desea que se suministre el polímero cargado negativamente). Por ejemplo, las composiciones farmacológicas inyectadas en la corriente sanguínea deberían ser solubles. Se conocen otros factores en la técnica e incluyen consideraciones tales como la toxicidad y formas que eviten que la composición o formulación ejerza su efecto. Las vías de administración que dan lugar a la absorción sistémica incluyen, sin limitaciones: la intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, inhalación, oral, intrapulmonar e intramuscular. Se ha demostrado que la tasa de entrada de un fármaco en la circulación es una función del peso molecular o el tamaño. El uso de un liposoma u otro vehículo farmacológico que comprenda los compuestos de la presente invención puede localizar potencialmente el fármaco, por ejemplo, en ciertos tipos de tejido, tal como el tejido del sistema reticular endotelial (RES). Una formulación de liposomas que pueda facilitar la asociación del fármaco con la superficie de las células, tales como, linfocitos y macrófagos también es útil.

La expresión "administración local" se refiere a una vía de administración en la que el agente se suministra a un sitio que sea adecuado o próximo, por ejemplo, dentro de aproximadamente 10 cm del sitio de la lesión o enfermedad.

La expresión "mutaciones conservadoras" se refiere a la sustitución, eliminación o adición de ácidos nucleicos que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño número de aminoácidos en una secuencia codificante en la que las alteraciones de ácido nucleico dan como resultado la sustitución de un aminoácido químicamente similar. Los aminoácidos que pueden servir como sustituciones conservadoras para cada uno incluyen los siguientes: Básicos: Arginina (R), Lisina (K), Histidina (H); Ácidos: Ácido aspártico (D), ácido glutámico (E), Asparagina (N), Glutamina (Q); hidrófilos: Glicina (G), Alanina (A), Valina (V), Leucina (L), Isoleucina (I); hidrófobos: Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W), Que contienen azufre: Metionina (M), Cisteína (C). Además, las secuencias que se diferencian por

variaciones conservadoras son generalmente homólogas.

Por "homología" se quiere decir la secuencia de nucleótidos de dos o más moléculas de ácido nucleico o dos o más secuencias de ácido nucleico o aminoácidos son parcial o completamente idénticas. En ciertas realizaciones la secuencia de ácido nucleico o aminoácidos homóloga tiene un 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % de similitud o identidad con un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 1, respectivamente.

Los "homólogos" pueden ser de origen natural o creados por síntesis artificial de uno o más ácidos nucleicos que tengan secuencias relacionadas, o mediante la modificación de uno o más ácidos nucleicos para producir ácidos nucleicos relacionados. Los ácidos nucleicos son homólogos cuando se derivan, natural o artificialmente, de una secuencia ancestral común (por ejemplo, ortólogos o parálogos). Si la homología entre dos ácidos nucleicos no se describe expresamente, la homología se puede deducir mediante una comparación entre dos o más secuencias de ácido nucleico. Si las secuencias demuestran algún grado de similitud de secuencia, por ejemplo, más de aproximadamente un 30 % a nivel de la estructura primaria de aminoácidos, se concluye que comparten un ancestro común. Para los fines de la presente invención, los genes son homólogos si las secuencias de ácido nucleico son suficientemente similares para permitir la recombinación y/o hibridación en condiciones de baja rigurosidad. Además, se considera que los polipéptidos son homólogos si sus secuencias de ácido nucleico son suficientemente similares para permitir la recombinación o hibridación en condiciones de baja rigurosidad, y opcionalmente demuestran una actividad de reparación de la membrana, y opcionalmente se pueden reconocer por (es decir, reaccionan de manera cruzada con) un anticuerpo específico para un epítipo contenido dentro de la secuencia de aminoácidos de al menos una de las SEQ ID NO: 1-6.

El término "célula" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, su sentido biológico habitual, y no se refiere a un organismo multicelular completo. La célula puede estar, por ejemplo, *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, por ejemplo, en un cultivo celular, o presente en un organismo multicelular, que incluye, por ejemplo, aves, plantas y mamíferos tales como seres humanos, vacas, ovejas, monos, simios, cerdos, perros y gatos. La célula puede ser procariota (por ejemplo, una célula bacteriana) o eucariota (por ejemplo, una célula vegetal o de mamífero).

La expresión "célula huésped" puede significar, pero no se limita de ninguna manera a, una célula que se puede utilizar para llevar un ácido nucleico heterólogo, o exprese un péptido o proteína codificados por un ácido nucleico heterólogo. Una célula huésped puede contener genes que no se encuentran dentro de la forma nativa (no recombinante) de la célula, genes que se encuentran en la forma nativa de la célula donde los genes se han modificado y reintroducido en la célula por medios artificiales, o un ácido nucleico endógeno para la célula que se ha modificado artificialmente sin retirar el ácido nucleico de la célula. Una célula huésped puede ser eucariota o procariota. Las condiciones de cultivo generales necesarias para el cultivo de bacterias se pueden encontrar en textos tales como BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, Vol. 1, N. R. Krieg, ed., Williams y Wilkins, Baltimore/London (1984). Una "célula huésped" también puede ser en la que los genes endógenos o promotores o ambos se han modificado para producir uno o más de los componentes del polipéptido del complejo de la invención.

El término "paciente" o "sujeto" se utiliza a lo largo de la memoria descriptiva para describir un animal, preferentemente un ser humano o un animal domesticado, para el que se proporciona el tratamiento, incluyendo el tratamiento profiláctico, con las composiciones de acuerdo con la presente invención. Para el tratamiento de las infecciones, afecciones o estados de enfermedad que son específicas de un animal específico tal como un paciente humano, el término paciente se refiere al del animal específico, incluyendo un animal domesticado tal como un perro o un gato o un animal de granja tal como un caballo, vaca, oveja, etc. En general, en la presente invención, el término paciente se refiere a un paciente humano a menos de que se establezca otra cosa o sea implícito del contexto del uso del término.

Como se utiliza en el presente documento, "péptidos P140" puede significar pero no se limita a, péptidos fosforilados derivados de la proteína U1-70K del empalmosoma, incluyendo las que se ejemplifican en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, y 5. En ciertos ejemplos P140 se utiliza para referirse específicamente a un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que la serina de la posición 10 está fosforilada.

La expresión "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" incluye una dosis de un fármaco que sea capaz de conseguir un efecto terapéutico en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco puede ser la cantidad que sea capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con una enfermedad o trastorno, por ejemplo, una lesión tisular o enfermedad o trastorno relacionados con los músculos. La cantidad exacta puede ser verificada por un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Un kit es cualquier producto fabricado (por ejemplo, un paquete o envase) que comprende al menos un reactivo, por ejemplo, una sonda, para detectar específicamente un marcador de la invención. El producto fabricado puede promocionarse, distribuirse, o venderse como una unidad para llevar a cabo los procedimientos de la presente invención. Los reactivos incluidos en dicho kit comprenden sondas/cebadores y/o anticuerpos para su uso en la detección de la sensibilidad y resistencia de la expresión genética. Además, los kits de la presente invención pueden

contener preferentemente instrucciones que describan un ensayo de detección adecuado. Dichos kits pueden utilizarse convenientemente, por ejemplo, en entornos clínicos, para diagnosticar pacientes que presenten síntomas de cáncer, en particular, pacientes que presentan la posible presencia de un tumor.

5 Las siguientes referencias, proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos utilizados en la presente invención: Singleton y col., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2ª ed. 1994); The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Walker ed., 1988); The Glossary of Genetics, 5ª Ed., R. Rieger y col. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale & Marham, the Harper Collins Dictionary of Biology (1991).

10 La presente descripción proporciona composiciones terapéuticas y procedimientos de uso de las mismas que se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que péptidos modificados químicamente como los que se describen en el presente documento son potentes moduladores de la autofagia. En particular, los péptidos y composiciones descritos en el presente documento son sorprendentemente eficaces para la reducción del exceso o hiper autofagia, incluyendo la autofagia mediada por chaperona (CMA). Como tal, la descripción proporciona composiciones y procedimientos para el tratamiento de la hiper-autofagia, por ejemplo, enfermedades y trastornos relacionados con la hiper-CMA.

15 La autofagia es un proceso fisiológico basado en lisosomas, que en condiciones básicas se produce a bajos niveles para degradar continuamente los constituyentes citoplásmicos no deseados y generar sustratos para la producción de energía. Durante el estrés oxidativo, la hipoxia o el agotamiento nutricional, su nivel aumenta para permitir la supervivencia celular. La autofagia representa por lo tanto un núcleo implicado en la homeostasis celular (Awan y Deng, 2014; He y Klionsky, 2009; Mizushima, 2007; Okamoto, 2014; Ravikumar y col., 2010). También tiene un papel
20 pivotante en la diferenciación de muchos linajes, incluyendo los adipocitos, eritrocitos y linfocitos, y remodelación tisular (Cenci, 2014; Lee y col., 2014; Mizushima y Komatsu, 2011; Mizushima y Levine, 2010; Nedjic y col., 2008; Pampliega y col., 2013). En condiciones ambientales específicas, sin embargo, la autofagia también puede mediar en la muerte celular y es mecánicamente importante para distinguir la muerte celular autofágica, que se refiere a la muerte celular "por" autofagia, de la muerte celular "con" autofagia (Kroemer y Levine, 2008; Marino y col., 2014; Ryter et al.,
25 2014; Shen y col., 2012). Por lo tanto, estudios recientes sugiere que los procesos de autofagia y apoptosis están estrechamente unidos y comparten comunicación entre los elementos de transducción de la señal. Se ha demostrado en particular que ciertas proteínas relacionadas con autofagia (ATG) tienen papeles duales en la regulación de la autofagia y apoptosis. Este es el caso de la ATG5 y su pareja de unión la ATG12, la proteína 1 superenrollada tipo moesina/miosina que interactúa con BCL-2 (BECLIN1/beclin-1), la *Atg6* ortóloga de los mamíferos respecto a la de levaduras/proteína de clasificación vacuolar (Vps)-30 que actúa durante la formación de los autofagosomas interactuando con la ruta PI3K clase III, y la cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulo (MAP1LC3/LC3) una *Atg8* ortóloga de mamíferos respecto a la de levaduras, por ejemplo (Kang y col., 2011; Konishi y col., 2012; Li y col., 2012; Marquez y col., 2012). Otras formas de muerte celular también están interconectadas con la autofagia, tal como la necrosis, necroptosis (muerte celular no apoptótica independiente de la caspasa, dependiente de Fas regulado), y piroptosis (muerte celular dependiente de caspasa-1) (Ryter y col., 2014).

30 Se han identificado tres tipos principales de autofagia y se pueden distinguir por sus funciones fisiológicas y los mecanismos que utilizan para suministrar la carga citoplásmica a los lisosomas (**Figura 1A**). Son la macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperona o CMA (Cuervo, 2004; Feng y col., 2014, Kaushik y Cuervo, 2012; Okamoto, 2014). De hecho, se han descrito muchas más formas de autofagia. Se puede hacer mención, por ejemplo,
40 de la agregofagia (por proteínas agregadas), mitofagia (por mitocondrias), ribofagia (por ribosomas), pexofagia (por peroxisomas), reticulofagia (por el retículo endoplásmico, RE) y xenofagia (por agentes patógenos). Por lo tanto, nos damos cuenta de que, aunque se veía originalmente como un sistema de degradación citoplásmica no selectivo (aleatorio), la autofagia participa actualmente en un proceso altamente selectivo y estrechamente regulado de suministro de sustratos.

45 La macroautofagia (a la que se hace referencia comúnmente como "autofagia", que en algunos casos crea confusión en la bibliografía) se mantiene como el proceso autofágico principal debido a su capacidad para atrapar masivamente macromoléculas y orgánulos completos. Los últimos se capturan en autofagosomas de doble membrana en donde se degradan. Por lo tanto, representa un mecanismo alternativo de la degradación proteasómica, que más bien trata
50 proteínas intracelulares de vida corta, aunque se ha descrito que se produce una intercomunicación que se está entendiendo cada vez más, entre el sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) y la macroautofagia (Cuervo y Wong, 2014; Kirkin y col. 2009; Korolchuk y col., 2010; Lilienbaum y col., 2013; Ravikumar y col., 2010). La fusión de autofagosomas con los lisosomas da lugar a la formación de autolisosoma en los que los constituyentes celulares englobados - incluyendo gotículas de lípido y agregados proteicos- se degradan mediante las glicosidasas, proteasas, lipasas y sulfatasas lisosómicas (**Figura 1B**). En lo concerniente al proceso de CMA, las proteínas que contienen un motivo peptídico específico relacionado bioquímicamente con KFERQ son reconocidos por la chaperona proteica HSPA8/HSC70 antes de internalizarse y degradarse en los lisosomas (**Figura 1A**). Por el contrario, en la microautofagia, los componentes citosólicos se captan directamente mediante invaginaciones de la membrana lisosómica (**Figura 1A**).

60 Las rutas autofágicas están reguladas genéticamente por las proteínas que pertenecen a la familia genética ATG y están bien caracterizadas en levaduras y mamíferos (Codogno y col., 2012; Klionsky y Emr, 2000; Lamb y col., 2013; Mizushima y col., 2011; Oshumi, 2014; Shibutani y Yoshimori, 2014). Las proteínas ATG están conservadas

evolutivamente y cada una de ellas tiene una función específica durante la autofagia. Es a través principalmente del descubrimiento de que ciertos genes *ATG* podían asociarse con síndromes autoinmunitarios por lo que se han generado estudios adicionales para entender las relaciones que existen entre autofagia e inmunidad. Los análisis genéticos indicaban eficazmente que algunos polimorfismos de los genes *ATG* podían transmitir la susceptibilidad a diferentes trastornos autoinmunitarios. De esta manera los estudios de asociación del genoma amplio (GWAS) que se llevaron a cabo en pacientes con SLE identificaron varios polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) localizados en genes *ATG*, que se han asociado con la existencia de enfermedad (Harley y col., 2008; Orozco y col., 2011). Se descubrió que un SNP localizado en la región intergénica entre *ATC5* y *PRDM1* se correlacionaba con una mayor expresión de ARNm de *ATG5* (Zhou y col., 2011). La asociación genética entre *ATG5* y la susceptibilidad al SLE se ha confirmado en estudios individuales, pero no se ha encontrado en otros (Järvinen y col., 2012). De manera interesante, un meta-análisis reciente en asiáticos demostró una fuerte asociación de los SNP sobre *DRAM1* con la susceptibilidad al SLE (Yang y col., 2013). Este gen codifica un activador de macroautofagia en respuesta a las señales de estrés mediadas por p53. En pacientes con CD, un estudio GWA identificó el rs2241880, en el mapeo hacia el locus del *ATG16L1*, como una variante de susceptibilidad (Hampe y col., 2007). Se demostró una interacción estadísticamente significativa con respecto al riesgo de CD entre el rs2241880 y las variantes de susceptibilidad establecidas *CARD15/NOD2* (dominio 2 que contiene la oligomerización de unión al nucleótido). De manera interesante no había asociación entre rs2241880 y la colitis ulcerativa, otra enfermedad intestinal inflamatoria relacionada estrechamente. Los datos recientes demostraron que los ratones mutantes en *Atg16L1* son resistentes a la enfermedad intestinal inducida por el modelo de patógeno bacteriano *Citrobacter rodentium* (Marchiando y col., 2013). El fenotipo hiperinmunitario y los efectos protectores desarrollado en estos ratones se perdía en ratones mutantes dobles *Atg16L1/Nod2*, indicando que la susceptibilidad de la deficiencia de *Nod2* es dominante sobre el beneficio de la deficiencia de *Atg16L1*. *ATG16L1* es clave en la formación del autofagosoma, siendo parte del complejo *ATG12-ATG5*, que es necesario para el reclutamiento de *MAP1LC3* (Mizushima y col., 2011). La retirada de *ATG16L1* anula la capacidad de las células para formar autofagosomas (Saitoh y col., 2008). Más recientemente se ha descrito que la variante proteica que contiene una sustitución Ala → Thr en la posición 300 es altamente sensible a la escisión por la caspasa 3, que se activa durante el estrés celular (Murthy y col., 2014). La destrucción de *ATG16L1T300A* discapacitaba la autofagia y aumentaba la liberación de citocinas proinflamatorias *TNF-α* y *IL-1α*. Se han descrito varios SNP en asociación con la CD en el denominado gen de la familia M de GTPasas relacionada con la inmunidad (IRGM) (Glas y col., 2013; Lu y col., 2013). Los resultados indicaban que los polimorfismos del gen de autofagia IRGM transmitían susceptibilidad a la CD, pero no a la colitis ulcerativa, especialmente en los europeos. El IRGM es un miembro de la familia de GTPasas inducibles por interferón que transmiten una defensa autofágica contra agentes patógenos intracelulares como el *M. tuberculosis*. El IRGM controla este último aumentando la maduración de fagosomas micobacterianos (Singh y col., 2006).

En conjunto, estos datos argumentan un fuerte impacto de los elementos de autofagia en varios aspectos de la inmunidad, incluyendo la protección frente a agentes infecciosos y el control de las respuestas inflamatorias y autoinmunitarias, así como en la tumorigénesis y el cáncer. Paradójicamente, solo recientemente por los estudios experimentales basados en la investigación celular y molecular se ha arrojado alguna luz sobre la implicación de la autofagia en la inmunidad. Se han publicado recientemente varios artículos de revisión exhaustiva sobre este tema con un énfasis particular sobre el papel de la autofagia en la infección y la inflamación (Cenci, 2014; Deretic, 2012; Deretic y col., 2013; Gros y Muller, 2014; Levine y col., 2011; Oliva y Cenci, 2014; Puleston y Simon, 2013; Ravikumar y col., 2010). La presente revisión se enfoca principalmente sobre la autofagia en autoinmunidad, en relación con la posible modificación del sistema inmunitario mediante moléculas pequeñas y péptidos con el fin de desviar las respuestas inmunitarias perjudiciales y restaurar al menos parcialmente la propia tolerancia que está alterada.

Las respuestas inmunitarias innatas tienen influyen de manera importante en la inmunidad adaptativa en la inducción y regulación de las enfermedades autoinmunitarias. En la inmunidad innata, la autofagia trabaja a diferentes niveles, principalmente controlando la activación y liberación de ciertas citocinas y quimiocinas (Deretic 2012; Deretic y col., 2013; Gros y Muller, 2014; Jones y col., 2013; Saitoh y Akira, 2010). La autofagia activaría la secreción de *TNFα*, interleucina (IL)-6, IL-8 e interferón (IFN) tipo I mientras controla la producción de IL-1α y β (la última mediante la regulación de la activación del inflammasoma y dirigiéndose a la pro-IL-1β para la degradación). IL-18 e IFN tipo I. A su vez, algunas citocinas secretadas tienen influencia sobre la autofagia. Así, los auxiliares T tipo 1 (Th1) y las citocinas proinflamatorias tales como IFN-γ (vía IRGM), *TNFα*, IL-1α, y β, IL-23, las especies reactivas al oxígeno (ROS) y la incorporación de algunos TLR (mecanismos que siguen siendo poco entendidos) inducen autofagia. El TWEAK (inductor de apoptosis débil tipo TNF, en los miotubos C2C12), la IL-2 de los linfocitos T CD4+, la IL-6 de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y el TGF-β de las líneas celulares de hepatocarcinoma también promueven la autofagia. Por el contrario, se descubrió que los Th2 y las citocinas reguladoras tales como IL-4, IL-13 e IL-10 mediante un efecto sobre las rutas STAT-3 o 6 y la ruta serina/treonina proteína cinasa (AKT) activan la diana de rapamicina en mamíferos (mTOR), que inhibe la serina/treonina proteína cinasa ULK1 y por lo tanto la formación de autofagosomas (Gutierrez y col., 2004; Jones y col., 2013). Mediante su efecto sobre la secreción de citocinas, particularmente en células presentadoras de antígeno (APC), la autofagia representa un regulador pivotante de las respuestas inmunitarias (Cenci, 2014; Deretic y col., 2013; Gros y Muller, 2014; Levine y col., 2011; Nedjic y col., 2008; Ravikumar y col., 2010, Saitoh y Akira, 2010).

Aunque aún no se ha reconocido hasta dicho nivel de importancia crucial en los libros de texto, la autofagia de hecho ejerce profundos efectos sobre diferentes aspectos de la inmunidad adaptativa. Es un actor principal en la selección

tímica de los linfocitos T, que afecta también a la homeostasis, repertorio y polarización de los linfocitos T, la supervivencia de los linfocitos B, la tolerancia inmunitaria, y la presentación de antígenos.

5 El descubrimiento de que la autofagia es un elemento regulador clave para el suministro de autoantígenos a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) ha sido un punto de giro crítico (Dengjel y col., 2005; Paludan y col., 2005; Zhou y col., 2005). En el momento de este hallazgo, estaba establecido clásicamente que las moléculas del MHC I presentaban péptidos desde la fuente proteica intracelular a los linfocitos T mientras que las moléculas del MHC II presentaban péptidos antigénicos de proteínas de membrana y exógenas. La imagen general de la activación de los linfocitos T por el péptido MHC II fue así reconsiderado considerablemente y se sugirieron y analizaron adicionalmente nuevos nexos entre la respuesta inmunitaria y el estrés celular, el metabolismo celular, los nutrientes celulares y el entorno celular. De manera incidental, es interesante señalar que a continuación de los experimentos en los que se incubaron potentes inhibidores de la macroautofagia que actúan sobre la actividad de la PI 3 cinasa, es decir, wortmannina, LY294002 y 3-metiladenina (3-MA) con la línea celular BMC-2 de macrófagos transfectados con ED52-68-eGFP (un fragmento peptídico que proviene de la proteína I-ED transmembrana) y se demostró que no tenían efecto, se concluyó que la macroautofagia no era un mecanismo para que las proteínas citoplásmicas expresadas tuvieran acceso al sitio luminal de unión peptídica de las moléculas del MHC II (Dani y col., 2004). En ese momento se publicaron datos conflictivos, que podían resultar de las propiedades inherentes del antígeno que era estudiado, su semivida y el tráfico intracelular (vesicular o no), y el tipo de APC (Dörfel y col., 2005; Leung y col., 2010; Paludan y col., 2005).

20 Los datos más recientes han demostrado que en las APC que son menos activas proteolíticamente que otras células tales como los macrófagos, la escisión por las cisteína proteasas lisosómicas - conocidas en general como catepsinas - de las partículas y proteínas que finalmente alcanzan los autolisosomas aumentan los fragmentos proteicos, lo que constituirá la fuente principal de péptidos para las moléculas del MHC II (Figura 1C). Los lisosomas y autolisosomas tienen un pH de 4-4,5, que es óptimo para las catepsinas. Por lo tanto, y de importancia en el contexto de la autoinmunidad, las moléculas del MHC II pueden unirse a péptidos generados de los antígenos endógenos que se generan por la proteólisis lisosómica. Dichos antígenos endógenos pueden ser de origen membranoso, citoplásmico (incluyendo los componentes de vesículas) o nuclear y pueden haber sido procesados en la red endolisosómica mediante varias formas de autofagia para el procesamiento y presentación posterior por las moléculas del MHC II para promover la sensibilización de los linfocitos T CD4+ (Blum y col., 2013; Münz, 2012). De manera interesante, en su trabajo pionero, Stevanovic, Rammensee y col. Ya demostraron que la inducción de autofagia por privación alteraba el balance de las proteasas activas en los lisosomas (Dengjel y col., 2005), lo que, como consecuencia, puede cambiar la calidad de los péptidos que se cargan en el MHC II.

35 Durante la última década, el papel y regulación de proteasas específicas sobre la liberación y procesamiento de los autoantígenos se ha estudiado extensamente (van Kasteren y Overkleeft, 2014; Villadangos y col., 1999) y se ha demostrado en particular que un conjunto distinto de catepsinas trabaja en diferentes APC, por ejemplo, en células dendríticas (CD) y linfocitos B (Burster y col., 2004; Manoury y col., 2002). También existen múltiples mecanismos (incluyendo la regulación positiva o la regulación negativa gobernadas por el entorno), que están implicadas en el control de la actividad de proteasas, inclusive en endosomas individuales, y que afectan fuertemente en la presentación de antígenos (Dengjel y col., 2005; van Kasteren y Overkleeft, 2014). Las proteasas endolisosómicas son por lo tanto factores clave para generar antígenos que finalmente se presentarán a los linfocitos T. Mediante un proceso por etapas que implica a la asparagina endopeptidasa (AEP) también conocida como legumina, cistatina C, catepsinas específicas y otras proteasas aún sin especificar, las proteasas endolisosómicas actúan para el procesamiento de la cadena invariante (Ii) unida a la molécula del MHC II en la cadena peptídica invariante asociada a clase II (CLIP), generando de esta manera moléculas del MHC II receptoras de péptidos en las que el péptido CLIP se intercambia por un péptido de alta afinidad por la enzima HLA-DM (Figura 1C) antes de su transporte a la superficie celular de las APC para presentarlo a los linfocitos T CD4+ (Neeftjes y col., 2011). Las proteasas endolisosómicas, incluyendo la AEP, también actúan para generar epítopos que se presentarán mediante las moléculas del MHC II funcionales (Colbert y col., 2009; Matthews y col., 2010; van Kasteren y Overkleeft, 2014).

50 En los muchos ejemplos de antígenos que se han examinado hasta ahora, se descubrió que la estabilidad es un factor determinante que tiene influencia en la presentación antigénica. Además, debido a que la escisión mediante catepsinas puede liberar epítopos, pero también destruir algunos otros, la regulación por catepsinas es incluso más estratégica para la definición del panel final de péptidos antigénicos que se suministran. Finalmente, otro papel importante de las proteasas endolisosómicas en la presentación de antígenos se basa en su influencia sobre la señalización del receptor TLR. Inicialmente reivindicado al observar el efecto de la cloroquina (CQ) sobre la señalización TLR9 (Hong y col., 2004; Matsumoto y col., 2008), se ha demostrado después que las proteasas endolisosómicas también activan los TLR 3, 7 y 8 endosómicos (Manoury, 2013) y que el modo de acción no era el propuesto en los primeros estudios. De hecho, sea por TLR9 o por los TLR endosómicos, las proteasas endolisosómicas actuarían convirtiendo el receptor de una forma de longitud completa no señalizadora a una forma más corta eliminada de la región del extremo N (Ewald y col., 2008; Park y col., 2008). Aunque los mecanismos precisos que están detrás de este efecto - sobre todo considerando las proteasas específicas que están implicadas - sigue siendo un tema de debate, se mantiene que dicho efecto puede ser estratégico ya que la señalización de TLR es crucial para la maduración de las CD que dicta la actividad proteasa y en consecuencia las influencias de la calidad de los péptidos que se presentan en las moléculas del MHC II. Estos datos resaltan la importancia de los TLR en los procesos de autofagia en conjunción con la inmunidad tanto innata (véase anteriormente; Xu y col., 2007) como adaptativa.

La importancia de la autofagia en la inmunidad también viene de los experimentos que se llevan a cabo con ratones o células que se han modificado para la baja expresión de genes ATG. Utilizando esta estrategia, asociada al conocimiento creciente de los genes que aparecen defectuosos en algunos individuos, ha sido posible aproximarse mejor al papel potencial de algunas proteínas ATG y establecer algunas relaciones con enfermedades humanas (Choi y col., 2013; Jiang y Mizushima, 2014; Majai y col., 2014). Por lo tanto, utilizando ratones con una eliminación específica de linfocitos B de Atg5, un gen implicado en el alargamiento de la membrana del autofagosoma, se ha demostrado que en los linfocitos B progenitores deficientes en autofagia la transición desde el estadio de pro-linfocito B a pre-linfocito B en la médula ósea era defectuosa (Miller y col., 2008). Los estudios en ratones en los que se había eliminado condicionalmente el Atg5 de los linfocitos B revelaron además que este gen es esencial para la homeostasis de las células plasmáticas (CP) (Conway y col., 2013). En estos ratones se producía un cambio de clase, pero las respuestas de anticuerpo disminuían fuertemente tras la inmunización específica, infección parasitaria e inflamación mucosa. Estos datos y otros (Pengo y col., 2013) resaltan la importancia del ATG5 no solo en el desarrollo temprano de linfocitos B sino también en la activación tardía de linfocitos B y diferenciación de CP. La eliminación condicional de genes esenciales de autofagia como el Atg5 (Stephenson y col., 2009), Atg7 (Pua y col., 2009; Jia y He, 2011), Atg3 (Jia y He, 2011) también demostraban que la microautofagia es crítica para la supervivencia de los linfocitos T periféricos. Algunos genes Atg son importantes en un cuadro de infección.

Por lo tanto, utilizando fibroblastos embrionarios de ratón (MEF) que carecían del ATG16L1 humano o Atg7, Atg9a, o Atg14, Oshima y col. (2014) se demostró la importancia del ATG16L1, ATG7 y ATG16L1, pero no el ATG9A y ATG14, en el reclutamiento inducido por IFN- γ de GTPasas relacionadas con la inmunidad en el patógeno intracelular *T. gondii*. Se han descrito varios ejemplos de diferentes formas de procesos de autofagia, incluyendo la macroautofagia, CMA, y mitofagia en los que los genes de autofagia se han eliminado o está sobre expresados, en algunos casos en tejidos específicos. Los ejemplos son ratones knockout (KO) *Pink1/parkin*, los ratones mutantes *Atg16L1* y los doble mutantes *Atg16L1/Nod2* descritos anteriormente, ratones mutantes de *Sqstm1/p62/A170* (que codifican la proteína multifuncional SQSTM1, también conocida como proteína adaptadora/de almacén de señalización), modelos de eliminación condicional invalidante *Beclin-1* o *Vps34*, por citar solo unos cuantos. También se introdujeron algunas mutaciones que afectan a las parejas de unión de elementos clave de las rutas de autofagia. Así, se ha demostrado recientemente que la eliminación del gen que codifica la proteína 2 de membrana asociada al lisosoma (LAMP-2A) en linfocitos T producen respuestas deficientes *in vivo* frente a la inmunización o infección con *L. monocytogenes* (Valdor y col., 2014). En estos ratones, se descubrió que la CMA en los linfocitos T se alteraba con la edad. Se debería mencionar aquí que los ratones invalidados para la HSPA8 no son viables, como los ratones KO *Beclin-1* que morían *in utero* o los ratones KO *Atg5* que mueren a las 24 h después del nacimiento debido al menos en parte a la producción deficiente de aminoácidos.

Las estrechas relaciones entre autofagia e inmunidad que se han expuesto anteriormente explican fácilmente que cualquier desregulación de la maquinaria autofágica puede afectar distintos aspectos de las respuestas inmunitarias y dar lugar al desarrollo de autoinmunidad (Gros y Muller, 2014; Lleo y col., 2007; Pierdominici y col., 2012). El aumento de autofagia, que permita la supervivencia de linfocitos autorreactivos, puede promover la autoinmunidad. Además, la autofagia, que produce autoantígenos mediante la digestión de proteínas intracelulares puede participar en el inicio o mantenimiento de la autoinmunidad. Además de los SNP y los genes de susceptibilidad, varios estudios han resaltado que la expresión de algunos genes relacionados con los procesos autofágicos se modifican durante la autoinmunidad. En la artritis reumatoide (RA) se ha demostrado que la expresión genética tanto de ATG7 como de BECLIN-1 aumenta en los osteoclastos de los pacientes (Lin y col., 2013). Se descubrió que la expresión de Atg7 aumentaba por la citocina proinflamatoria TNF- α , un elemento crítico para la patogénesis mediante la regulación de la inflamación sinovial. Otros estudios también han demostrado que en el síndrome de desmielinización autoinmunitario y en la esclerosis múltiple (MS), la expresión del gen ATG5 también está significativamente elevada en comparación con controles sanos (Alirezai y col., 2009).

Basándose en evidencias genéticas, los enlaces potenciales entre la autofagia y la autoinmunidad se han sugerido durante una década. En general, sin embargo, los argumentos experimentales a nivel celular y molecular que muestren un papel de la autofagia en el inicio y/o la progresión de enfermedades autoinmunitarias aún son escasos (Tabla 1). En los pacientes con SLE y dos modelos de lupus en ratón no relacionados genéticamente, a saber, ratones MRL/lpr y (NZBxNZW)F1 (NZB/W), se muestra en un informe fundamental que la autofagia está desregulada en los linfocitos T (Gros y col., 2012). Se descubrió que las vacuolas autofágicas estaban sobre representadas en los linfocitos T indicando que la autofagia estaba hiperactivada. Esta desregulación era incluso más obvia cuando los linfocitos T se estimulaban mediante activadores químicos de las rutas de señalización relacionadas con el receptor de linfocitos T (TCR). La elevación del compartimento autofágico no se encontraba en todos los linfocitos T, sino que se restringía a un subconjunto de estos. Como se sabe que la autofagia está implicada en la supervivencia celular, estos resultados sugieren que la autofagia podría promover la supervivencia de los linfocitos T autorreactivos durante la enfermedad. Alessandri y col. (2012) demostró un aumento de la isoforma MAP1LC3-II asociada al autofagosoma en linfocitos T, que se producía principalmente en linfocitos T CD4 intactos aislados de pacientes con SLE. Estos resultados, que confirman los datos propios de los inventores, sugieren que hay una desregulación intrínseca de la actividad autofágica en los linfocitos T del SLE. Los autores propusieron otra interpretación en la conclusión de que los linfocitos T del SLE eran resistentes a la inducción macroautofágica y podrían por tanto ser más tendentes a la apoptosis. Llegaron a esta conclusión re-estimulando los linfocitos T con rapamicina o con suero autólogo (pro-autofágico). Es posible, sin embargo, que los linfocitos T del SLE estén ya al máximo nivel de carga de autofagosoma y que la re-exposición a su

propio suero no tenga un efecto adicional sobre la actividad autofágica. En cualquier caso, estos datos confirman el papel pro-autofágico del suero de SLE sobre los linfocitos T normales. Pierdominici y sus colegas también observaron que el aumento de autofagia se correlacionaba con las puntuaciones de actividad de la enfermedad, una información importante que podría aprovecharse en estrategias terapéuticas futuras (Alessandri y col., 2012; Pierdominici y col., 2012; 2014).

Estudios más recientes han reforzado y extendido los trabajos pioneros descritos anteriormente. Por lo tanto, por primera vez, Clarke y col. (2014) demostraron en ratones NZB/W que la activación de la macroautofagia también se produce en los linfocitos B, y más particularmente en los estadios del desarrollo temprano y transicional del desarrollo de linfocitos B (antes de la aparición de la enfermedad). En pacientes con lupus, también se activó la autofagia en comparación con los individuos sanos, y de nuevo, esta activación se producía principalmente en linfocitos B intactos. Cuando se utilizaban inhibidores de la autofagia tales como 3-MA, bafilomicina A1 o CQ, la diferenciación y supervivencia de plasmablastos apenas se producía. Estos hallazgos se deben relacionar con la sobre producción de autoanticuerpos en el suero de ratones tendentes a lupus y pacientes con lupus. En su estudio, los autores confirmaron que además de los linfocitos B, la autofagia aumentaba en linfocitos T de los pacientes con lupus, y que, en ambos casos, esta activación se podría correlacionar con la actividad de la enfermedad. Li y col. (2014) también describieron resultados convincentes que demostraban que, en comparación con los controles, la autofagia estaba significativamente activada en macrófagos recolectados de un modelo inducido de lupus en el ratón (ratones BALB/c que desarrollan una enfermedad tipo lupus después de la administración en adyuvante de Freund de ADN derivado de linfocitos homólogos activados) y en las PBMC de pacientes con lupus. La transferencia adoptiva de macrófagos de KO Beclin-1 mejoraba significativamente las afecciones clínicas de los ratones receptores (una disminución de los niveles de proteinuria, reducción del depósito de complejo renal típico, la mejora de glomerulonefritis) así como las características biológicas (disminución de los niveles de anticuerpo anti-dsADN en el suero y las citocinas proinflamatorias circulantes IL-6 y TNF- α según se medía por ELISA).

Unos cuantos estudios han resaltado el papel de la autofagia en otras enfermedades autoinmunitarias, principalmente la RA humana (Lin y col., 2013; Kato y col., 2014; Xu y col., 2013) y en la encefalomiелitis autoinmunitaria, un modelo de MS (Bhattacharya y col., 2014). La autofagia parece estar activada en osteoclastos de pacientes con RA y regula la diferenciación de osteoclastos (Lin y col., 2013). Este aumento del proceso autofágico, también se encontraba en los fibroblastos sinoviales del RA en comparación con los fibroblastos sinoviales de osteoartritis por Kato y col. (2014) se correlaciona con una disminución del nivel de apoptosis en los tejidos sinoviales en la RA (Xu y col., 2013). Se concluyó de estas observaciones que la activación de la autofagia inducida por el TNF- α sobre producido da lugar a la reducción de la apoptosis en las articulaciones y de manera más importante causa la supervivencia de fibroblastos sinoviales, que son responsables de la patología. Esto resalta de nuevo el efecto dual de la autofagia, que es citoprotectora cuando elimina componentes celulares mal plegados o demasiado abundantes, pero en exceso puede convertirse en perjudicial y genera efectos negativos.

Varios hallazgos recientes subrayan el papel pivotante de la macroautofagia en el control de la masa muscular, y se ha descrito una mala regulación de la autofagia en miopatías y distrofias musculares (Sandri y col., 2013). Sin embargo, la información en relación con la posible disfunción del proceso de autofagia es escasa con respecto a los pacientes con fibromialgia, por ejemplo, o con polimiositis (Temiz y col., 2009; Lloyd, 2010), una rara enfermedad con un componente autoinmunitario que se caracteriza por inflamación y degeneración de los músculos. Por otra parte, se ha observado (o se sospechan) defectos de autofagia en varios cuadros autoinmunitarios, incluyendo CD, SLE, posiblemente RA y MS (**Tabla 1**) así como en síndromes inflamatorios, principalmente en enfermedades pulmonares (Mizumura y col., 2012). Se ha anticipado fuertemente que, en todas las situaciones, la modulación de la autofagia, con el fin de reestablecer una regulación apropiada del flujo en particular, puede rescatar alteraciones y mejorar el estado clínico de los pacientes tratados.

Como se ha subrayado recientemente (Gros y Muller, 2014), algunas moléculas que se utilizaron durante años para tratar las enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias se han descubierto mucho más tarde que se dirigían a uno u otro tipo de procesos de autofagia. Hoy en día, de hecho, hay muy pocos compuestos específicos que se dirijan a etapas precisas de las rutas de autofagia, e incluso a una única ruta en particular (Anguiano y col., 2013), y bastante sorprendentemente, las dianas de algunos reguladores de autofagia que se prescriben ampliamente a los pacientes no se conocen realmente. Este es el caso, en particular, de la CQ y la hidrocloroquina (HCQ) o de la dexametasona, cuyo modo de acción (MOA) aún está siendo debatido (véase posteriormente).

Varios de los artículos de revisión detallados han cubierto recientemente de manera exhaustiva distintos aspectos, estructurales y funcionales de familias de compuestos, activadores e inhibidores, que se han generado para modular la autofagia directa o indirectamente (Baek y col., 2012; Cheong y col., 2012; Fleming y col., 2011; Gros y Muller, 2014; Jiang y Mizushima, 2014; Renna y col., 2010; Rubinsztein y col., 2012; van Kasteren y Overkleeft, 2014; Vidal y col., 2014). Evaluadas en ensayos rigurosamente calibrados llevados a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* (Mizushima y col., 2010; Klionsky y col., 2012), algunas de estas moléculas pequeñas pueden ser relevantes para modular enfermedades autoinmunitarias en cuadros apropiados. En los ejemplos que se muestran en la siguiente sección, los inventores se limitarán a unos cuantos reguladores farmacológicos de autofagia con eficacia clínica establecida o prometedora en enfermedades autoinmunitarias.

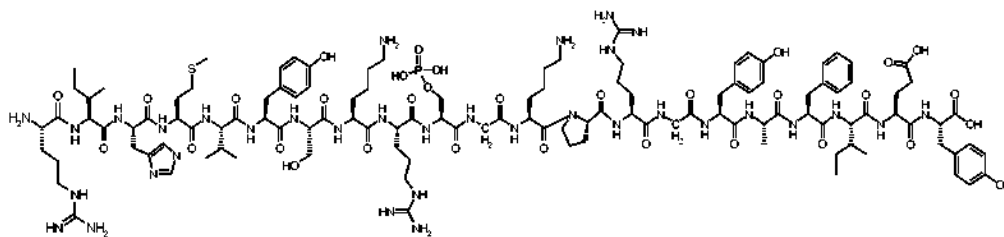
Las pequeñas moléculas y péptidos farmacológicos presentan varias propiedades ventajosas que los hacen

excelentes terapéuticos, principalmente para enfermedades autoinmunitarias. Además de su síntesis y producción que pueden estar altamente optimizadas, y en algunos casos extraordinariamente simples en comparación con algunos biológicos, y automatizables, las pequeñas moléculas y péptidos seleccionados como principios activos de las composiciones se caracterizan por su estabilidad y robustez, fácil manejo, las dosis relativamente bajas que se tienen que administrar a los pacientes y su coste, que se mantiene razonable con respecto a la mayoría de los biológicos. Las moléculas pequeñas y péptidos cortos no son inmunogénicos *per se*, lo que es otra ventaja considerable para tratar pacientes con enfermedades autoinmunitarias crónicas (Schall y Muller, 2014).

La presente descripción proporciona composiciones terapéuticas y procedimientos de uso de las mismas que se basan en el descubrimiento sorprendente e inesperado de que péptidos modificados químicamente como los que se describen en el presente documento son potentes moduladores de la autofagia. Los péptidos modificados químicamente, por ejemplo, los péptidos P140, como se describe en el presente documento se derivan de la proteína empalmosómica U1-70K. Los péptidos descritos y las composiciones que comprenden cantidades eficaces de los mismos son eficaces para tratar, prevenir y/o mejorar los síntomas de enfermedades caracterizadas por un aumento del flujo de autofagia; es decir, relacionadas con la hiper autofagia tales como los trastornos autoinmunitarios relacionados con la hiper-CMA. En consecuencia, en ciertos aspectos adicionales, la divulgación proporciona procedimientos para producir y utilizar los péptidos descritos y las composiciones que comprenden los mismos para el tratamiento, prevención y/o mejora de los síntomas de enfermedades caracterizadas por una hiper-autofagia, por ejemplo, hiper-flujo de CMA.

Por lo tanto, en un aspecto la presente descripción proporciona péptidos modificados químicamente de SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5, incluyendo los derivados, análogos y formas salinas de los mismos.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido aislado que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1: RIHMYSKRSGKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 1], o



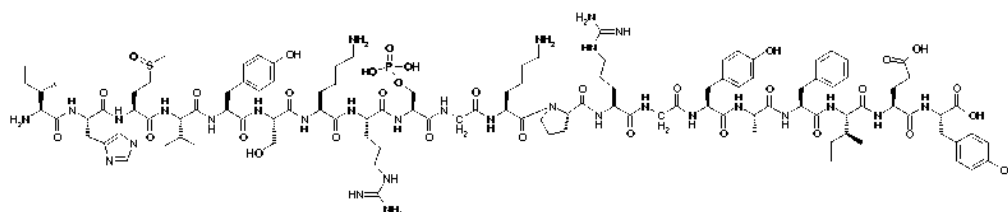
o una sal del mismo, que tenga al menos una modificación postraduccional seleccionada de entre el grupo que consiste en la fosforilación de un resto de serina, la oxidación de un resto de metionina, y la acetilación de un resto de lisina, y combinaciones de las mismas. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10, y un resto de metionina oxidado en la posición 4.

En ciertas realizaciones adicionales, el péptido de SEQ ID NO: 1 también comprende un resto de lisina acetilado. En particular dicho péptido de SEQ ID NO: 1 comprende una fosfoserina en la posición 10, y un resto de metionina oxidado en la posición 4, y una acetilación de una o ambas lisinas de la posición 8 y 12, y más particularmente comprende adicionalmente una fosfoserina en la posición 7.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente, o una sal del mismo, que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos: IHMVYSKRSGKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 2],

en la que la Serina (S) de la posición 9 está fosforilada, y la Metionina (M) de la posición 3 está oxidada.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido del compuesto I que tiene la siguiente fórmula:



El compuesto I también se puede representar por:

IHM(O)VYSKRS(PO₃H₂)GKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 5]

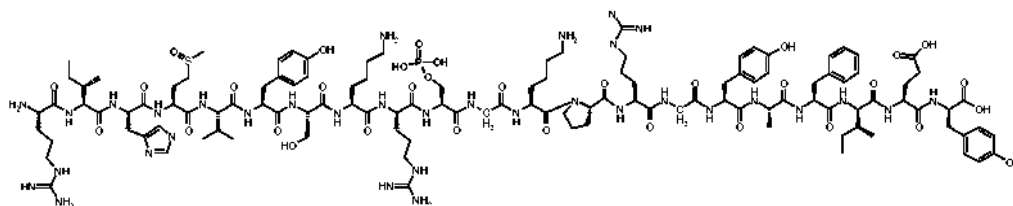
en la que "M(O)" representa la metionina oxidada, y "S(PO₃H₂)" representa la fosfoserina.

- 5 Estos péptidos se derivan de la proteína U1 snRNP de 70 kDa humana (SEQ ID NO: 3), y se corresponden con la región delimitada por el segmento de aminoácidos que se extiende desde el resto 132 al resto 151 de la SEQ ID NO: 3. Formalmente, el resto que está fosforilado se corresponde con el aminoácido de la posición 140 desde la primera metionina de la SEQ ID NO: 3, y el resto que está oxidado se corresponde con el aminoácido de la posición 134 desde la primera metionina de la SEQ ID NO: 3.

- 10 En ciertos aspectos, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, que tenga al menos una modificación postraduccional seleccionada de entre el grupo que consiste en la fosforilación de un resto de serina, la oxidación de un resto de metionina, y la acetilación de un resto de lisina, y combinaciones de las mismas. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido aislado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10. En ciertas realizaciones, la SEQ ID NO: 1 también tiene un resto de Metionina oxidado en la posición 4. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido de SEQ ID NO: 1 también comprende un resto de lisina acetilado.

- 20 En aspectos adicionales, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una sal del mismo, que tenga al menos una modificación postraduccional seleccionada de entre el grupo que consiste en la fosforilación de un resto de serina, la oxidación de un resto de metionina, y la acetilación de un resto de lisina, y combinaciones de las mismas. En una realización de este aspecto, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 9, y un resto de metionina oxidado en la posición 3. En ciertas realizaciones adicionales, el péptido de SEQ ID NO: 2 también comprende un resto de lisina acetilado.

En ciertas realizaciones, la descripción proporciona un péptido del compuesto II que tiene la siguiente fórmula:



- 30 El compuesto II también se puede representar por:
RIHM(O)VYSKRS(PO₃H₂)GKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 4]
en la que M(O) representa la oxidación de la metionina, y S(PO₃H₂) representa la fosforilación de la serina.

Por lo tanto, la descripción proporciona péptidos, o una sal de los mismos, que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos escogida de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5.

- 35 En una realización adicional, la descripción proporciona una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un péptido, o una sal del mismo, seleccionado de entre el grupo que consiste en la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una Metionina oxidada en la posición 3; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, o una sal del mismo, en el que el péptido comprende una fosfoserina en la posición 10; la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una Metionina oxidada en la posición 4; y una combinación de las mismas.

- 40 La descripción proporciona péptidos, y/o sales de los mismos, que comprenden o consisten en la secuencia de aminoácidos escogida de entre el grupo que consiste en la SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y combinaciones de los mismos, así como composiciones que comprenden los mismos.

- 45 En ciertas realizaciones, la descripción proporciona una composición que comprende un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, que comprende una fosfoserina en la posición 10. En ciertas realizaciones, el péptido P140 también comprende una metionina oxidada en la posición 4 (por ejemplo, la SEQ ID NO: 4) (al que también se hace referencia en el presente documento como Compuesto II o P140 (MO)). En ciertas realizaciones, la descripción proporciona el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1, que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada en la posición 4, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que comprende una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de

aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 1, que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada en la posición 4, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De acuerdo con la presente descripción, el péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5, respectivamente, se modifica al menos por una modificación postraduccional (modificaciones que se producen después de la síntesis de los péptidos). En ciertas realizaciones, la modificación postraduccional se selecciona de entre el grupo que consiste en fosforilación (adición de un fosfato PO_3H_2), por ejemplo, la fosforilación de un resto de serina; oxidación, por ejemplo, oxidación de un resto de metionina; acetilación, por ejemplo, acetilación de un resto de lisina; y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, el péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2, 4 o 5, respectivamente, está modificado al menos por dos modificaciones postraduccionales.

En una realización preferida, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 2, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 2, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que comprende una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 2, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

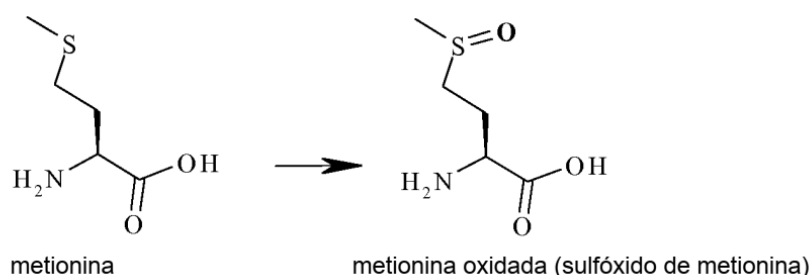
En otra realización, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 4, que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada en la posición 4, o una sal del mismo. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 4 que comprende una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada en la posición 4, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que comprende una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 4 que comprende una fosfoserina en la posición 10, o una sal del mismo, y una metionina oxidada en la posición 4, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En otra realización, la descripción proporciona un péptido (recombinante o sintetizado) aislado y/o modificado químicamente que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5, que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo. En ciertas realizaciones, la descripción proporciona el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5 que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable. En ciertas realizaciones adicionales, la descripción proporciona una composición, por ejemplo, una composición terapéutica, que comprende una cantidad eficaz de un péptido que tiene la secuencia de aminoácidos que se expone en la SEQ ID NO: 5 que comprende una fosfoserina en la posición 9 y una metionina oxidada en la posición 3, o una sal del mismo, y un vehículo, por ejemplo, un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Sorprendente e inesperadamente, se descubrió que los péptidos que se describen en el presente documento son más estables *in vitro* en comparación con el equivalente no oxidado. La estabilidad se mide como se desvela en la sección de ejemplos. El péptido fosforilado-oxidado se degrada menos espontáneamente en solución en comparación con el equivalente no oxidado, aumentando dicha estabilidad sus propiedades biológicas. Además, los inventores han identificado sorprendentemente que la oxidación de la metionina aumenta la estabilidad del péptido, sin afectar el efecto biológico de dicho péptido, al contrario de la enseñanza de la técnica anterior. Además, se ha informado en gran medida en la técnica que las proteínas o péptidos que contienen metioninas oxidadas tienen alteraciones en su estructura tridimensional y/o bioactividad. Los péptidos modificados como se describe en el presente documento tienen una afinidad por la proteína HSC70 esencialmente idéntica a los equivalentes no oxidados como se desvela en la sección de ejemplos.

En ciertas realizaciones, la oxidación se produce en la Metionina (M) de la posición 9 de la SEQ ID NO: 2, o en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1, que son las posiciones equivalentes a la posición 134 de la SEQ ID NO: 3. El átomo de azufre está oxidado como se ilustra posteriormente:

55



Los péptidos anteriores (SEQ ID NO: 1, 2, 4 y 5) se pueden sintetizar por técnicas utilizadas comúnmente en la técnica, tal como síntesis biológica o síntesis química. La síntesis biológica se refiere a la producción, *in vivo*, *in vitro* o *ex vivo*, del péptido de interés, mediante la transcripción y traducción de una molécula de ácido nucleico que codifica dichos péptidos.

5

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico:

MGNATHCAYATGGTNTAYWSNAARMGNWSNGGNAARCCNMGNG

GNTAYGCNTTYATHGARTAYTRR [SEQ ID NO: 6]

se transcribe y traduce sea en un sistema *in vitro*, o en un organismo huésped, con el fin de producir el péptido de SEQ ID NO: 1. El péptido producido se purifica de acuerdo con técnicas bien conocidas.

10 La síntesis química consiste en la polimerización del péptido deseado añadiendo los aminoácidos necesarios. Se desvela un procedimiento en la sección de ejemplos.

Es posible sintetizar químicamente los péptidos de SEQ ID NO: 1 y 2 mediante química de fase sólida clásica Fmoc (N-[9-fluorenil] metoxicarbonil) y se purifican mediante cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa (HPLC: Neimark y Briand, 1993; Monneaux y col., 2003, Eur. J. Immunol. 33, 287-296; Page y col., 2009, PloS ONE 4,e5273).

15

También es posible sintetizar directamente los péptidos de SEQ ID NO: 1 y 2, en los que los restos respectivos de las posiciones 10 y 9 están fosforilados. Para este fin, durante la síntesis de péptidos se utilizó un derivado de serina tipo Fmoc-Ser(PO(Obz)OH)-OH, en la posición deseada.

20 El grupo fosfato (-PO₃H₂) también se puede añadir después de la síntesis del péptido, de acuerdo con protocolos bien conocidos en la técnica.

La serina puede fosforilarse incubando los péptidos de SEQ ID NO: 1 o 2 con la serina cinasa específica escogida de entre la proteína cinasa A o C (PKA o PKC) o la caseína cinasa II en presencia de trifosfato de adenosina (ATP). Los péptidos se fosforilan en una serina (en la posición 6 o 9 de la SEQ ID NO: 2, o en la posición 7 o 10 de la SEQ ID NO: 1), o ambas serinas. El péptido fosforilado deseado se separó de los otros por ejemplo mediante cromatografía.

25 Una adición química de -PO₃H₂ también se puede añadir en la posición específica (la posición 9 de la SEQ ID NO: 2, o en la posición 10 de la SEQ ID NO: 1), utilizando un grupo protector específico, que el experto puede escoger fácilmente de acuerdo con su conocimiento común.

Se puede utilizar cualquiera de otras técnicas conocidas en la técnica, que permitan la fosforilación específica de la serina.

30 En ciertas realizaciones, la oxidación de la Metionina se lleva a cabo de acuerdo con el siguiente procedimiento:

tratamiento con H₂O₂, 20 mM, a 37 °C durante 4 horas, o
 en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO; e₂SO), 0,1 M más HCl 0,5 M a 22 °C durante 30 a 180 min.

Se puede utilizar cualquiera de otras técnicas conocidas en la técnica, que permitan la oxidación específica de la metionina.

35 En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritas en el presente documento, el péptido proporcionado por la descripción puede estar presente en forma de sal conocida por un experto en la técnica, tal como, por ejemplo, sales de sodio, sales de amonio, sales de calcio, sales de magnesio, sales de potasio, sales acetatos, sales carbonatos, sales citratos, sales cloruro, sales sulfato, sales clorhidrato, sales bromhidrato, sales bencenosulfonato, sales fosfato, sales dihidrogenofosfato, sales succinato, sales citrato, sales tartrato, sales lactato, sales mandelato, sales metano sulfonato (mesilato) o sales p-tolueno sulfonato (tosilato). Esta lista se proporciona a modo de ejemplo y no significa que sea limitante de la presente invención. Por ejemplo, el experto en la técnica puede determinar fácilmente, de

40

acuerdo con sus conocimientos, la sal apropiada.

En realizaciones adicionales, la descripción proporciona un péptido que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de:

RIHMYSKRSGKPRGYAFIEY [SEQ ID NO: 1],

- 5 que comprende una fosfoserina en la posición 10. En ciertas realizaciones, el péptido fosforilado también comprende una metionina oxidada en la posición 4, o una sal del mismo. En una realización ventajosa, la invención se refiere al péptido que se ha definido anteriormente, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una sal del mismo.

Composiciones farmacéuticas

- 10 En otro aspecto, la presente descripción, proporciona composiciones que comprenden una cantidad eficaz de uno o más de los péptidos descritos en el presente documento, y un excipiente o vehículo. Por lo tanto, en realizaciones adicionales, la descripción también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos un péptido como se describe en el presente documento, o un producto de combinación como se ha descrito anteriormente, que incluye adicionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 15 Los péptidos (a los que también se hace referencia en el presente documento como "principios activos") como se describen en el presente documento se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones comprenden normalmente un péptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de dichos medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio convencional o agente sea incompatible con el principio activo, se contempla el uso del mismo en la composición. También se pueden incorporar principios activos suplementarios en las composiciones.

- 25 La descripción proporciona procedimientos para la preparación de composiciones farmacéuticas. Dichos procedimientos comprenden la formulación de un vehículo farmacéuticamente aceptable con un péptido como se describe en el presente documento. Dichas composiciones pueden incluir adicionalmente agentes activos adicionales como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, la invención incluye adicionalmente procedimientos para la preparación de una composición farmacéutica formulando un vehículo farmacéuticamente aceptable con un péptido como se ha descrito en el presente documento, y uno o más principios activos adicionales.

- Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía pretendida de administración. Ejemplos de vías de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral, nasal (por ejemplo, por inhalación), transdérmica (tópica), transmucosa, y rectal. Las soluciones o suspensiones que se utilizan para la aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea puede incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como el agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como el alcohol bencílico; antioxidantes tales como el ácido ascórbico o el bisulfato sódico; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como el cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como el ácido clorhídrico o el hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis hechos de cristal o plástico.

- Las composiciones adecuadas para su uso inyectable incluyen soluciones acuosas (cuando sean hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL (BASF; Parsippany, N.J.) o solución salina tampón fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto de que hay una fácil administración con jeringa. Debe ser estable en condiciones de fabricación y almacenamiento y se debe conservar contra la acción contaminante de microorganismos tales como las bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante distintos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como el manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede llevar a cabo incluyendo en la composición un agente que retrasan la absorción, por ejemplo, el monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando el principio activo (por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo) en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con uno o una combinación de los ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido por esterilización por filtración. En general, las dispersiones

- 5 se preparan incorporando el principio activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y luego incorporando los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son el secado al vacío y el secado por congelación que dan lugar a un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución esterilizada por filtración previamente.
- Las composiciones orales incluyen en general un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden incluir en cápsulas de gelatina o comprimidos en comprimidos. Con el fin de la administración terapéutica oral el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para su uso como un enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se enjuaga y se escupe o traga.
- Para la administración por inhalación, los compuestos se suministran en forma de un pulverizador en aerosol a partir de un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.
- 15 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera que se va a penetrar. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosa se puede conseguir mediante el uso de pulverizadores nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en ungüentos, bálsamos, geles, o cremas como se conoce en general en la técnica.
- 20 Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencional como manteca de coco y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.
- En una realización, los principios activos se preparan con vehículos que protegen el compuesto contra la rápida eliminación del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulado. Se pueden utilizar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilenvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Los procedimientos para la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también se pueden obtener comercialmente en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También se pueden utilizar suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas que tienen anticuerpos monoclonales incorporados en o sobre ellos) como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con procedimientos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Pat. de EE. UU. N.º 4.522.811.
- 25 Es especialmente ventajoso formular las composiciones oral o parenteral en forma de dosificación unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de dosificación. Forma de dosificación unitaria como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que se va a tratar; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La especificación para las formas de dosificación unitaria de la invención se dicta y dependen directamente de las características únicas del principio activo y el efecto terapéutico particular que se va a conseguir, y las limitaciones inherentes en las técnicas de la composición tal como de un principio activo para el tratamiento de individuos.
- 35 En ciertas realizaciones de los procedimientos proporcionados en el presente documento, el procedimiento incluye la etapa de administración de una dosificación desde aproximadamente 100 ng a aproximadamente 5 mg de una composición terapéutica o farmacéutica como se describe en el presente documento. En ciertas realizaciones, por ejemplo, en los seres humanos, la composición farmacéutica como se describe en el presente documento puede contener manitol como vehículo, y la composición se administra desde 10 µg a 500 µg, preferentemente 200 µg, en una única administración.
- 40 En ciertos aspectos adicionales, el régimen de dosificación se puede reproducir desde 1 a 3 veces/semana, una vez a la semana a cada cuatro semanas mientras sea necesario con una ventana terapéutica y así durante varios años. En una realización preferida, el régimen de dosificación es una vez cada 4 semanas de tratamiento, pero puede repetirse dos veces al año durante varios años. Un ejemplo de administración es: una inyección de 200 µg de péptido, cada 4 semanas, durante 12 semanas (es decir, 3 inyecciones separadas entre ellas por 4 semanas). El tratamiento se puede prolongar mediante la administración cada 6 meses.
- 45 Los vehículos farmacéuticamente preferidos pueden comprender, por ejemplo, goma de xantano, goma de algarrobo, galactosa, otros sacáridos, oligosacáridos y/o polisacáridos, almidón, fragmentos de almidón, dextrina, goma británica y mezclas de los mismos. Ventajosamente, el vehículo farmacéuticamente aceptable es de origen natural. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, o puede comprender adicionalmente, un diluyente sacarídico inerte seleccionado de entre un monosacárido o disacárido. Un sacárido ventajoso es el manitol.
- 55 Ventajosamente, la invención se refiere a una composición farmacéutica como se ha definido anteriormente, que tiene la forma de un liposoma, o nanopartícula, o en forma de una solución. Una solución ventajosa es una solución que comprende desde un 1 a un 15 % en particular aproximadamente un 10 % de manitol. La solución debería ser iso-

osmolar.

La invención también se refiere a un fármaco que comprende un producto de combinación como se ha definido anteriormente, para su uso simultáneo, separado o secuencial.

Procedimientos terapéuticos

5 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para el tratamiento, prevención o mejora de los síntomas de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición terapéutica como se describe en el presente documento a un sujeto que lo necesite, en el que la composición es eficaz para el tratamiento, prevención y/o mejora de al menos una enfermedad o trastorno relacionados con la inflamación crónica.

10 En un aspecto adicional, la presente descripción proporciona procedimientos para el tratamiento, prevención o mejora de los síntomas de una una enfermedad o trastorno del sistema inmunitario relacionados con la hiperautofagia, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria relacionada con la hiper-CMA, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición terapéutica como se describe en el presente documento a un sujeto que lo necesite, en el que la composición es eficaz para el tratamiento, prevención y/o mejora de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno relacionados con la hiperautofagia, por ejemplo, la hiper-CMA. (por ejemplo, la Tabla 3, posteriormente).

15 En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno inflamatorio crónico relacionados con la autofagia excesiva o aumentada, por ejemplo, CMA. En ciertas realizaciones, la enfermedad o trastorno es al menos uno de entre artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), miopatías, distrofia muscular (MD), enfermedad de Crohn (CD), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), fibromialgia, polimiositis, enfermedad pulmonar, trombocitopenia inmunitaria crónica (ITP), lupus neuropsiquiátrico, síndrome de Gougerot-Sjögren, artritis reumatoide, enfermedad de Guillain-Barré (crónica/CIDP), asma (aguda o crónica), inflamación eosinofílica de vías aéreas, síndrome de colon irritable (IBS o IBD), polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), diabetes tipo II, regeneración de tejido graso, escleroderma, psoriasis, enfermedad de Alzheimer o Parkinson.

20 En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se escoge de entre: patologías autoinmunitarias de la familia de enfermedades del tejido conjuntivo (enfermedades orgánicas sistémicas no específicas), por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome de Sjögren, o artritis juvenil crónica; y/o patologías autoinmunitarias específicas de órgano, por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes dependiente de insulina, enfermedad de Crohn, o enfermedades bullosas. En una realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria es el SLE.

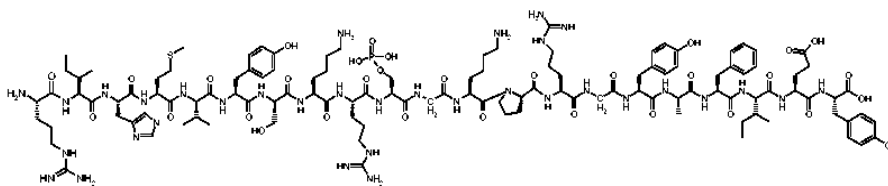
25 En un aspecto adicional, la descripción también proporciona procedimientos de tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, que comprende la etapa de administración a un sujeto (por ejemplo, un paciente tal como un mamífero, por ejemplo, un ser humano) que necesita dicho tratamiento, una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento, en el que la composición es suficiente para efectuar dicho tratamiento. En otro aspecto, la descripción proporciona una composición como se describe en el presente documento para su uso en un procedimiento para el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria que comprende la etapa de administración a un paciente que lo necesite, de una cantidad eficaz de una composición farmacéutica como se describe en el presente documento, en el que la composición es suficiente para efectuar dicho tratamiento.

30 En ciertas realizaciones, la enfermedad autoinmunitaria se escoge de entre: patologías autoinmunitarias de la familia de enfermedades del tejido conjuntivo (enfermedades orgánicas sistémicas no específicas), por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (SLE), artritis reumatoide, enfermedad mixta del tejido conjuntivo, síndrome de Sjögren, o artritis juvenil crónica; y/o patologías autoinmunitarias específicas de órgano, por ejemplo, esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn, o enfermedades bullosas. En una realización preferida, la enfermedad autoinmunitaria es el SLE.

35 La descripción también proporciona un fármaco que comprende un péptido como se describe en el presente documento, y/o una combinación como se describe en el presente documento, para su uso como un fármaco, en particular para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias.

40 Sin quedar ligados por teoría alguna en particular, los inventores hacen la hipótesis de que la unión a la HSC70 es importante para la mediación de la unión del fosfopéptido y la internalización, y, por lo tanto, mediar los efectos terapéuticos de los péptidos como se describen en el presente documento. En consecuencia, la descripción también proporciona un procedimiento de tratamiento o mejora de una afección producida por la sobre expresión de HSC70 en la superficie celular que comprende las etapas de administración de una cantidad eficaz de un fosfopéptido, por ejemplo, un péptido modificado como se describe en el presente documento, a un paciente que lo necesite, en el que el péptido trata o efectúa la mejora de al menos un síntoma de la afección.

45 El péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, en el que la Serina de la posición 10 está fosforilada se corresponde con el Compuesto III posterior:



EJEMPLOS

Ejemplo 1: Síntesis química de los péptidos.

- 5 El péptido P140 y P140(MO) se sintetizaron utilizando la química de fase sólida clásica Fmoc (N-[9-fluorenil] metoxicarbonil) y se purifican mediante cromatografía líquida de altas prestaciones de fase inversa (HPLC: Neimark y Briand, 1993; Monneaux y col., 2003, Eur. J. Immunol. 33, 287-296; Page y col., 2009, PloS ONE 4,e5273). Se comprobó su homogeneidad mediante HPLC analítica y se evaluó su identidad mediante LC/MS en un sistema Finnigan LCQ Advantage Max (Thermo Fischer Scientific). Tras completar la reacción, los péptidos se purificaron mediante HPLC.
- 10 Con el fin de introducir la fosforilación en el resto de serina equivalente al resto 140 de la SEQ ID NO: 3, se utilizó un derivado de serina tipo Fmoc-Ser(PO(Obz)OH)-OH. El tiempo de acoplamiento estaba aumentado a 30 minutos y se llevó a cabo un segundo acoplamiento sistemáticamente. Tras la escisión en medio ácido, cada péptido se precipitó mediante éter frío, se solubilizó en una solución de agua y acetonitrilo y finalmente se liofilizó. Los péptidos se purificaron entonces mediante RP-HPLC, se había analizado su integridad y purea mediante HPLC analítica y
- 15 mediante espectrometría de masas (Maldi-TOF). Se introdujo la oxidación como se ha mencionado anteriormente.

Ejemplo 2: Estabilidad de los péptidos.

- 20 La estabilidad del péptido de SEQ ID NO: 2 en el que la serina de la posición 10 está fosforilada y la metionina en la posición 4 está oxidada (P140 (MO)), y el péptido de SEQ ID NO: 1 en el que la serina en la posición 10 está fosforilada (P140) se midió a 37 °C, en una solución de manitol al 10 % (v/v). Para cada péptido, se han ensayado 3 concentraciones: 200, 100 y 50 µg/ml.

En el momento indicado, la integridad de los péptidos P140 y P140 (MO) se midieron en solución salina mediante cromatografía líquida de altas prestaciones a partir del área del pico correspondiente al péptido intacto.

Los resultados se muestran en la Figura 3.

Las siguientes tablas 1 y 2 resumen los resultados:

25

Tabla 1

Estabilidad (%)	Días	P140(MO)			P140		
		200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml
	0	100	100	100	100	100	100
	20	100	99,1	100	98,7	97,5	95,5
	40	100	99,5	100	98,5	96,2	93,2
	60	-	-	-	97,9	95,5	91,5
	80	-	-	-	97,6	94,5	90,3
	100	100	99,1	99,4	97,4	93,4	89,6

Tabla 2

Estabilidad (%)	Días	P140(MO)			P140		
		200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml	200 µg/ml	100 µg/ml	50 µg/ml
	Ecuación lineal	y=100	y = - 0,0064x + 100,11	y = - 0,0064x + 99,677	y = - 0,0238x + 99,535	y = - 0,0612x + 99,25	y = - 0,099x + 98,299
	Coefficiente de correlación	N/A	R ² = 0,8571	R ² = 0,4157	R ² = 0,8854	R ² = 0,9538	R ² = 0,9065
	95 % de estabilidad (previsto)	∞	2 años + 2 meses	2 años	6 meses	2 meses	1 meses

La estabilidad se mide utilizando la superficie del pico de HPLC.

La estabilidad del P140 (MO) se mantiene sin cambios (un 100 %, 99,1 % y 99,4 %) durante 100 días a 37 °C, para cada una de las concentraciones ensayadas (50 a 200 µg/ml).

La estabilidad del P140 disminuye a lo largo del tiempo y se reduce después de los 100 días a 37 °C (un 97,4 %, un 93,4 % y un 89,6 %) para cada una de las concentraciones ensayadas (50 a 200 µg/ml).

- 5 Estos datos demuestran que la oxidación de la metionina en el péptido P140 aumenta la estabilidad del péptido. El P140 (MO) es estable en todas las concentraciones ensayadas sobre los 100 días.

Ejemplo 2: Efecto terapéutico de los péptidos en ratones MRL/lpr.

- 10 La estirpe de ratón MRL/lpr es una subestirpe que está genéticamente predispuesto al desarrollo de un síndrome tipo lupus eritematoso sistémico, que se ha descubierto que es clínicamente similar a la enfermedad humana. Se ha determinado que esta estirpe de ratón lleva una mutación en el gen fas. También, el MRL/lpr es un modelo útil para estudiar las deficiencias comportamentales y cognitivas que se encuentran en las enfermedades autoinmunitarias y la eficacia de los agentes inmunosupresores [Monneaux y col., 2003, Eur. J. Immunol. 33, 287-296].

2.1 Análisis de supervivencia

- 15 Los ratones MRL/lpr hembra de cinco semanas de edad recibieron el P140 o el péptido P140(MO) por vía intravenosa como se había descrito (Monneaux y col., 2003, Eur. J. Immunol. 33, 287-296). Todos los protocolos experimentales se llevaron a cabo con la aprobación del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales local (CREMEAS). Como control, se inyectó NaCl a los ratones.

Se utilizaron veinte ratones para cada péptido o NaCl.

Los resultados se muestran en la Figura 4.

- 20 Se había aplicado un Ensayo de rango logarítmico (Mantel-Cox) y los resultados eran los siguientes: NaCl vs P140 $p=0,0686$, NaCl vs P140(MO) $p=0,0026$, P140 vs P140 M(O) $p=0,2366$.

La supervivencia media de los ratones era: NaCl = 25 semanas, P140 = 29 semanas y P140(MO) > 40 semanas. Estos resultados demuestran la eficacia del péptido P140 (MO) *in vivo* en el tratamiento de lupus, en ratones.

2.2 Análisis de proteinuria

- 25 Se midió la proteinuria de los ratones anteriores en orina reciente utilizando Albustix (Bayer Diagnostics) y se estimó semi-cuantitativamente de acuerdo con una escala de 0-4 recomendada por el fabricante (sin proteinuria = 0; trazas = 1; 1+ = 2; 2+ = 3; 3+ = 4; 4+ = 5).

Los resultados se muestran en la Figura 5.

- 30 En esta figura, se observa que la proteinuria es menos importante y aparece tardíamente en los ratones tratados con P140 (MO) en comparación con los ratones sin tratar.

2.3 Análisis de celularidad

- 35 Se inyectaron a los ratones MRL/lpr 100 µg/100 µl de P140 o de P140 (MO) y se estudió la celularidad (en sangre periférica) a los 5 días de esta única inyección. El recuento incluye todos los leucocitos. En vista del bajo número de ratones ensayados, se realizó un ensayo estadístico no paramétrico (Mann-Whitney). Los resultados se muestran en la Figura 6.

Por lo tanto, en un modelo murino de lupus agudo, el péptido de SEQ ID NO: 4 era capaz de disminuir la hiper celularidad periférica y retrasar los signos biológicos y clínicos de la enfermedad con una eficacia al menos similar al P140 o mejor.

Estadísticas

- 40 Se llevaron a cabo los ensayos estadísticos utilizando el GraphPad Prism versión 5.0. Se utiliza un ensayo ANOVA de dos vías para analizar la significación estadística de las diferencias de proteinuria entre los grupos de ratones de control y tratados con péptidos. La supervivencia de los ratones MRL/lpr hembra de control y tratados con un análogo del P140 se analizó mediante el procedimiento de Kaplan-Meier, y se determinó la significación de las diferencias mediante un ensayo de rango logarítmico. Para las otras variables, se evaluó la significación estadística utilizando el ensayo *t* de Student. Los valores de *p* menores de 0,05 se consideraron significativos.

Ejemplo 3: Afinidad de los péptidos por la proteína HSC70.

Se utilizó el sistema BIAcore 3000 (Biacore AB) para evaluar la unión de los péptidos P140 a la proteína HSC70 (Page y col., 2009, y 2011). El chip sensor CM5, el tensioactivo P20, el kit de acoplamiento de amina que contenía N-hidroxisuccinimida (NHS) y N-etil-N'-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), 2-(2-piridinilditio) etanolamina (PDEA) y

5 etanolamina eran de Biacore AB. Se llevaron a cabo los ensayos en el biosensor con el tampón HBS-EP como tampón de ejecución (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3 mM de EDTA, un 0,005 % de tensioactivo P20, pH 7,4). Los compuestos se diluyeron en tampón de ejecución. La superficie del chip sensor se regeneró después de cada experimento inyectando 10 µl de HCl 10 nM. Se inmovilizó la HSC70 bovina recombinante (Stressgen) sobre el flujo celular de un chip sensor CM5 mediante sus grupos tioles utilizando 35 µl de PDEA en 50 mM de tampón de borato, pH 8,3 sobre la matriz activada con NHS/EDC. Luego, se inyectaron 35 µl de HSC70 (100 µg/ml en tampón de formato, pH 4,3) hasta una respuesta de 13.000 unidades de respuesta (RU) correspondientes a 13 ng/mm² inmovilizados de HSC70. Veinte µl de una solución de 50 mM de cisteína/ 1 M de NaCl se utilizó para saturar los sitios sin ocupar en el chip. La medición de la unión directa de los péptidos P140 a la HSC70 se llevó a cabo a 25 °C con un caudal constante de 20 µl/min. El péptido P140 y los análogos se inyectaron en el flujo a diferentes concentraciones durante 3 min, seguido por una fase de disociación de 3 min. Los parámetros cinéticos se calcularon utilizando el software BIAeval 3.1 en una computadora personal. Se llevó a cabo el análisis utilizando el modelo de unión simple 1:1 de Langmuir. Los perfiles de unión específicos se obtuvieron tras restar la señal de respuesta del canal vacío de control y de la inyección de tampón blanco. El ajuste de cada modelo se juzgó mediante el valor χ^2 y la aleatoriedad de la distribución de restos en comparación con el modelo teórico.

Los resultados se muestran en las Tablas 3 y 4, y en las Figuras 7 y 8.

Estas tablas demuestran que la afinidad por HSC70 no es diferente estadísticamente entre los péptidos P140 y P140 (MO).

Por lo tanto, estos dos péptidos se unen con la misma eficacia a la HSC70.

20 **Ejemplo 3: Efecto del péptido P140 en la RA.**

En este ejemplo, se ensayó un péptido P140 (péptido 21-mérico lineal) que abarcaba la secuencia 131-151 de la proteína U1-70K empalmosómica y que contenía un resto de fosfoserina en la posición 140. Después del tratamiento con P140, se observó una acumulación de marcadores de autofagia SQSTM1 y MAP1LC3 en los linfocitos B MRL/lpr coincidente con una regulación negativa del flujo autofágico (Page y col., 2011). También se descubrió que la autofagia mediada por chaperona (CMA) era una diana del péptido P140 y se demostró que el efecto inhibidor del péptido P140 sobre la CMA está ligado probablemente a su capacidad para interactuar con la chaperona proteica HSPA8 (Page y col., 2009) y a que altera la composición de hetero complejos de HSPA8 (Macri y col., en prensa). La expresión de la HSPA8 y el componente limitante de CMA LAMP-2A, que está aumentado en los linfocitos B MRL/lpr, está regulado negativamente después de tratar los ratones con el péptido P140 (Page y col., 2011; Macri y col., en prensa). Se demostró adicionalmente que el P140, pero no el péptido no fosforilado que no protege contra el desarrollo de la enfermedad en ratones (Monneaux y col., 2003), utiliza la ruta endolisosómica dependiente de clatrina para entrar en los linfocitos B MRL/lpr y se acumula en la luz lisosómica donde puede obstaculizar directamente las funciones de chaperonización de la HSPA8 lisosómica, y también desestabiliza el LAMP-2A en los lisosomas como resultado de su efecto sobre la HSP90 (Macri y col., en prensa). Este efecto dual puede interferir con el procesamiento de (auto) antígenos endógenos y la carga de moléculas del MHC II y como consecuencia, dar lugar a la menor activación de linfocitos T autorreactivos que previamente se había demostrado experimentalmente (Monneaux y col., 2004; Monneaux y col., 2007).

Las investigaciones recientes sugieren que la autofagia está aumentada potencialmente en la RA, así como en otras enfermedades autoinmunitarias (Tabla 3; Wilhelm & Muller, remitido). Se ha propuesto esta activación para la enfermedad de Crohn (CD), RA, polimiositis (PM) y esclerosis múltiple (MS), pero no en la diabetes autoinmunitaria donde, por el contrario, la autofagia puede estar disminuida.

Tabla 3: Lista de enfermedades autoinmunitarias con fallo de autofagia

Enfermedades autoinmunitarias	Genes asociados	Disfunciones celulares	Referencias
CD (1)	ATG16L1		Hampe y col. 2007
	IRGM		Glas y col. 2003; Lu y col. 2013
SLE	ATG5		Harley y col. 2008; Zhou y col. 2011
	DRAM1		Yang y col. 2013
	PRDM1		Zhou y col. 2011
		Aumento de MaA en linfocitos T de ratones MRL/lpr y NZB/W y de pacientes: sobre representación de vacuolas autofágicas (WB, EM) ⁽²⁾	Gros y col. 2012

(continuación)

Enfermedades autoinmunitarias	Genes asociados	Disfunciones celulares	Referencias
		Desregulación de MaA en linfocitos T CD4 ⁺ de pacientes: aumento del marcador asociado a autofagosoma MAP1LC3 (WB)	Alessandri y col. 2012
		Hiperactividad de MaA en linfocitos B de ratones NZB/W y linfocitos B intactos de pacientes; aumento del número de autofagosomas (FACS, FM)	Clarke y col. 2014
		Activación de MaA en ratones con tendencia a lupus y pacientes: aumento de la expresión de ATG5, ATG12 y BECN1	Li y col. 21014
		Aumento de la expresión de HSPA8 en linfocitos B y T de ratones MRL/lpr (WB, FACS, PCR)	Page y col. 2011
		Aumento de la expresión de LAMP-2A y CTSD en linfocitos B de MRL/lpr; los lisosomas son defectuosos en los ratones MRL/lpr (WB, FACS, Q-PCR, ensayo <i>in vitro</i> para CMA)	Macri y col., en prensa
RA	ATG5		Orozco y col. 2011
	ATG7		Lin y col. 2013
	BECN1		Lin y col. 2013
		Activación de MaA en osteoclastos de pacientes: aumento de la expresión de BECN1 y ATG7 (WB)	Lin y col. 2013
		Aumento del proceso autofágico en fibroblastos sinoviales: aumento de la expresión de p62 y MAP1LC3 (WB, FM)	Kato y col. 2014
PM		Activación de MaA en fibras musculares: aumento de la expresión de MAP1LC3, CTSD y CTSB (WB)	Nogalska y col. 2010
MS	ATG5		Mayes y col. 2014, Alirezaei y col. 2009
		Desregulación de MaA en linfocitos T: aumento de la expresión de ATG5 (WB, PCR)	Alirezaei y col. 2009
CD (1)	ATG16L1		Hampe y col. 2007
	IRGM		Glas y col. 2003; Lu y col. 2013
Diabetes tipo I		Disminución de MaA en corazón de ratón diabético: reducción de la expresión de MAP1LC3 y ATG5/12 (WB, FM)	Xu y col. 2013; Yamahara y col. 2013
(1) Abreviaturas: ATG, gen relacionado con autofagia; BECN1, beclin-1; CD, Enfermedad de Crohn; CMA, autofagia mediada por chaperona; CTSB, catepsinas B; CTSD, catepsinas D; DRAM1, modulador de autofagia regulado por el daño; EM, microscopía electrónica; FM, microscopía de fluorescencia; HSPA8 proteína 8 de choque térmico; IRGM, proteína M de la familia de GTPasa relacionada con inmunidad; LAMP-2A, proteína 2A de membrana asociada al lisosoma; MaA, macroautofagia, MAP1LC3, cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulo; MS, esclerosis múltiple; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; PM, polimiositis; PRDM1, factor 1 de unión al dominio I regulador positivo; RA, artritis reumatoide; SLE, lupus eritematoso sistémico; WB, transferencia de Western. (2) El procedimiento utilizado para evaluar estos cambios se cierra entre paréntesis.			

- 5 El P140 *ex vivo* no induce proliferación de linfocitos T periféricos de pacientes con lupus (al contrario que la forma no fosforilada que lo hace y al contrario que los datos que se muestran *ex vivo* en el contexto de MRL/lpr) pero genera la secreción de altos niveles de citocina IL-10 reguladora en cultivos celulares (Monneaux y col., 2005). Se observó no proliferación y no producción de IL-10 en los cultivos cuando se ensayaban los linfocitos T de pacientes con otras enfermedades autoinmunitarias (Monneaux y col., 2005). Se evaluaron pacientes (n = 27) con artritis reumatoide (RA), síndrome de Sjögren primario, sordera autoinmunitaria, polimiositis, cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmunitaria, así como 4 pacientes hospitalizados por enfermedades no autoinmunitarias o infecciosas.
- 10 Estos datos (generados con pequeños grupos de pacientes) llevó a los inventores a concluir que lo más probable es que el péptido P140 estimule muy específicamente los linfocitos T CD4⁺ periféricos de lupus, pero no los linfocitos T de pacientes con otras afecciones patofisiológicas (Monneaux y col., 2005). Estos datos estaban también contra el potencial efecto del péptido P140 como posible regulador de defectos de la autofagia en estas enfermedades.
- 15 A continuación, se administró el péptido P140 en un modelo de ratón que desarrolla una enfermedad tipo RA (los inventores se anticiparon al uso de este modelo de ratón como control negativo de los ratones MRL/lpr con tendencia a lupus). Este modelo, llamado modelo de ratón de artritis inducida por colágeno (CIA), es el modelo de RA autoinmunitaria más comúnmente estudiado. En este modelo, se induce una artritis autoinmunitaria inmunizando

ratones DBA/1 con una emulsión de adyuvante completo de Freund (CFA) y colágeno tipo II (CII), y normalmente, los primeros signos de artritis aparecen en 21-28 días después de la inmunización (Brand y col., 2007). El CIA comparte varias características patológicas con la RA humana, y el CII es una proteína principal en el cartílago, el tejido diana de la RA. Las características patológicas incluyen la hiperplasia sinovial, infiltración de células mononucleares, y degradación del cartílago. La susceptibilidad en estos ratones se liga a la expresión de los genes específicos del MHC clase II, el DBA/1 tiene un haplotipo H-2^q.

El péptido P140 se administró de esta manera por vía intravenosa a los ratones DBA/1 el día -1, +7, +14 y +20 en un cuadro similar al que utilizaron los inventores en los ratones MRL/lpr (100 µg/inyección/ratón). El CII se inyectó los días +1 y +21 (200 µg, por vía intradérmica). Se hizo el seguimiento del peso de los ratones y su valoración clínica utilizando el procedimiento muy clásico. Los parámetros biológicos también se evaluaron (es decir, la respuesta de linfocitos T, la respuesta a anticuerpos, la histología de la articulación, etc.).

Los resultados obtenidos en este experimento demuestran que los esplenocitos T CD4⁺ de los ratones que recibieron el péptido revuelto ScP140 proliferan normalmente *ex vivo* en presencia de CII añadido a los cultivos (Figura 9; 100 µg CII /ml; medido utilizando el ensayo CFSE mediante FACS). Por el contrario, sin embargo, la proliferación estaba fuertemente disminuida cuando los linfocitos T CD4 se recolectaban del bazo de ratones que recibieron en péptido P140 ($p = 0,0539$ entre ScP140 y P140).

No se observaba ningún efecto cuando los linfocitos T CD8⁺ se ensayaron en las mismas condiciones. Se esperaba que los resultados posteriores caracterizaran esta respuesta con mucho más detalle. La histología también completó estos datos celulares.

En cualquier caso, estos resultados, que no se podían anticipar, sugieren un esquema operacional que podría imitarse en la RA el que se encuentra cuando los inventores ensayaron los linfocitos CD4⁺ de los ratones MRL/lpr con tendencia al lupus tratados con P140. En los ratones MRL/lpr, el P140 induce una disminución significativa de la expresión de MHC II en la superficie de los linfocitos B (mediante su efecto sobre la CMA), disminuyendo por lo tanto la presentación del péptido antigénico mediante células presentadoras de antígeno, que, como consecuencia de alugar a la disminución de reactividad de los linfocitos T autorreactivos periféricos y la mejora del estado de enfermedad. Por lo tanto, los datos demuestran que los péptidos P140 pueden ser eficaces en una variedad de otras afecciones patológicas en las que la reducción de la actividad de la CMA se desea.

Hoy en día, no están disponibles los datos que demuestren nivel celular que la CMA está alterada en la RA. No existe información con respecto a las propiedades de los lisosomas en esta patología. Las investigaciones futuras se deberían enfocar en la posible demostración de que el flujo autofágico está aumentado en ratones con RA y en los linfocitos B de los pacientes de RA y que la CMA está alterada en este cuadro.

Otros cuadros patofisiológicos se ensayarán para acumular datos pertinentes, sobre todo en CD, PM, escleroderma (SSc) y MS. Los modelos murinos establecidos están disponibles para CD (por ejemplo, ratones KO IL-10, ratones SAMP1/YitFc, o el modelo de peptidoglicano-polisacárido utilizando ratas endogámicas) y MS (modelos en rata y ratón de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, EAE). Hoy en día, sin embargo, los buenos modelos animales no existen para PM y SSc.

Ejemplo 4: Endocitosis de partículas P140.

Para la actividad del péptido P140, la unión de HSC70 y la endocitosis parecen ser importantes. Se cree que la endocitosis debería producirse mediante la ruta de la clatrina. Esto implica que el péptido + excipiente debería tener un tamaño en el intervalo de 30 a 500 nm de diámetro. Por ejemplo, el P140 + manitol están en la región de 100 nm mientras que el P140 + trehalosa están por debajo de 10 nm y por lo tanto no se unen eficazmente a la HSC70. Por ejemplo, la **Figura 10** muestra la captación celular del péptido P140 fluorescente en manitol al 5,4 % o trehalosa al 10 % en los linfocitos B MRL/lpr y células Raji según se visualiza mediante citometría de flujo. Los linfocitos B provenían de ratones MRL/lpr de 12-14 semanas de edad (células primarias); las células Raji son una línea celular establecida derivada en 1963 de linfocitos B de un paciente con linfoma de Burkitt. Hay mucha menos captación de P140 tanto en linfocitos B MRL/lpr y células Raji cuando el péptido se diluye en trehalosa que en manitol. Este resultado se confirmó utilizando microscopía confocal (**Figura 11**). Las imágenes confocales muestran el compartimento endosómico tardío en el que se localiza el P140 antes del asentamiento en los lisosomas; el DAPI identifica el ADN. Los resultados confirman los resultados de la citometría de flujo que cuando está en trehalosa, el péptido P140 entra en los linfocitos B mucho menos (véase la Tablas 4 y 5).

Tabla 4: P140 sobre HSC70

Péptido - concentración	ka(1/Ms)	kd (1/s)	Rmáx (RU)	RI (RU)	Cono de analito	KA(1/M)	KD(M)	Req (RU)	kobs(1/s)	Chi2
	450		83,3							3,17
P140-1.56 µM		3,12E-03		12,1	1,56 u	1,44E+05	6,94E-6	15,3	3,82E-03	
P140-3.12 µM		3,12E-03		20,9	3,12 u	1,44E+05	6,94E-6	25,8	4,52E-03	
P140-6.25 µM		3,12E-03		33,8	6,25 u	1,44E+05	6,94E-6	39,5	5,93E-03	
P140-12.5 µM		3,12E-03		62,5	12,5 u	1,44E+05	6,94E-6	53,6	8,74E-03	
P140-25 µM		3,12E-03		118	25 u	1,44E+05	6,94E-6	65,2	0,0144	

Tabla 5: P140(MO) sobre HSC70

Péptido - concentración	ka(1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Cono de analito	KA(1/M)	KD(M)	Req (RU)	kobs (1/s)	Chi2
	1,15E+3		39							1,18
P140(MO)-1.56 µM		2,20E-3		14	1,56 u	5,24E+5	1,91 E-6	17,6	4,00E-03	
P140(MO)-3.12 µM		2,20E-3		18,7	3,12 u	5,24E+5	1,91 E-6	24,2	5,80E-03	
P140(MO)-6.25 µM		2,20E-3		25,9	6,25 u	5,24E+5	1,91 E-6	29,9	9,40E-03	
P140(MO)-12.5 µM		2,20E-3		36,9	12,5 u	5,24E+5	1,91 E-6	33,9	0,0166	
P140(MO)-25 µM		2,20E-3		53,4	25 u	5,24E+5	1,91 E-6	36,3	0,031	

Ejemplo 5. Efecto antiinflamatorio del fosfopéptido P140 en un modelo de 15 días de inflamación eosinofílica de vías aéreas inducida por ovoalbúmina en ratones.

5 El efecto antiinflamatorio del fosfopéptido P140 se evaluó cuando se administraba localmente (por vía intranasal) o sistémicamente (por vía intravenosa) en un modelo de 15 días de inflamación hipereosinofílica de vías aéreas en ratones.

El fosfopéptido P140 se solubilizó en agua estéril (Braun) y se añadió solución salina estéril concentrada 10x para ajustar la osmolaridad a 300 mosm. La osmolaridad se controló con un micro osmómetro (Löser, tipo 15) y se validó (302 mosm).

10 El fosfopéptido P140 se utilizó *in vivo* a la dosis de 4 mg/kg por vía intranasal (i.n.) e intravenosa (i.v.). Los animales de control recibieron volúmenes equivalentes (1 ml/kg para la vía i.n. Y 2 ml/kg para la vía i.v.) de solución salina (Tabla 6).

15 Se sensibilizaron los ratones Balb/c macho de nueve semanas de edad mediante inyecciones intraperitoneales (i.p.) de una mezcla que contenía 50 µg de OVA (Sigma-Aldrich) y 2 mg de aluminio (Sigma-Aldrich) en 0,1 ml de solución salina. Los ratones se desafiaron mediante administración i.n. De 25 µl de OVA el día 5, luego 25 µl de OVA y/o solución salina el día 12, 13 y 14. Los ratones se trataron mediante inyección i.v. (2 ml/kg) o administración i.n. (1 ml/kg) de P140 o el disolvente el día 9 (véase la Figura 12).

Tabla 6

Grupo número	Número de ratón	Tratamiento	Desafío
1	1	Disolvente	S. salina
2	2	P140 (i.n.)	S. salina
3	2	P140 (i.v.)	S. salina
4	5	Disolvente	OVA
5	6	P140 (i.n.)	OVA
6	6	P140 (i.v.)	OVA

20 Se llevó a cabo un BAL veinticuatro horas después del desafío con LPS como se había descrito (Daubeuf, F. y Frossard, N. 2012. Performing Bronchoalveolar Lavage in the Mouse. *Curr Protoc Mouse Biol* 2:167-175). Los ratones se anestesiaron IP (Ketamina 150 mg/kg - Xilazina 10 mg/kg). La sangre se recolectó del corazón, se centrifugó a 10.000 g durante 2 min y se almacenó el suero a -20 °C. Después de la semi-escisión de la tráquea, se insertó una cánula de plástico y el espacio aéreo se lavó con 0,5 ml de NaCl al 0,9 % inyectados con una jeringa de 1 ml. Este procedimiento se llevó a cabo 10 veces. El sobrenadante inicial concentrado de los dos primeros lavados (volumen = 2 x 0,5 ml administrado, ~ 0,5 ml recuperado) se recolectó para las mediciones de citocinas. El fluido del BAL restante se centrifugó (300 g durante 5 min, 4 °C), y se agruparon los aglomerados celulares. El aglomerado celular se suspendió en 500 µl de NaCl al 0,9 % y se utilizó para el recuento celular total en un Analizador Celular Muse®. Los recuentos celulares diferenciales se evaluaron por citometría de flujo (citómetro LSRII®, BD Bioscience). Las células del BAL se añadieron con FCblock (0,5 µl, 553142, BD Bioscience) en una microplaca negra, y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Entonces, se añadieron los anticuerpos marcadores: CD11c-FITC (557400, BD bioscience), Gr-1-Pe-eFluor610 (61-5931-82, eBioscience), CD11b-APC-Cy7 (557657, BD bioscience), CD45-AlexaFluor700 (103128, BioLegend), CD3-BV605 (564009, BD bioscience), CD19-PE-Cy7 (552854, BD bioscience). Los anticuerpos se incubaron con las células del BAL durante 30 min a temperatura ambiente antes de la adición de DAPI (5 µl, BD bioscience), y se llevó a cabo la citometría inmediatamente.

35 Los datos se presentan como las medias ± SEM. Las diferencias entre los grupos se ensayaron en cuanto a la significación estadística utilizando un ANOVA de una vía seguido por un post-ensayo de Turkey. Para el análisis estadístico, se agruparon los grupos de control 1, 2 y 3. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando p≤0,05.

40 El análisis de las células de las vías aéreas recuperadas en el fluido del BAL en los ratones de control desafiados con solución salina demuestra que el fosfopéptido P140 administrado por vía i.n. o i.v. tiene poco efecto *per se* sobre el número de células recuperadas en el fluido del BAL al compararse con el vehículo (solución salina), y en particular no tiene un efecto proinflamatorio. (Véase la Tabla 7).

Tabla 7

	Ratones	Células totales	Macrófagos	Eosinófilos	neutrófilos	Linfocitos T	Linfocitos B
Ctrl	NL415-2_1	333 568	328 362	149	223	4 834	149
P140-IN	NL415-2_2	392 461	388 102	168	56	4 135	112
P140-IN	NL415-2_8	438 573	434 029	103	61	4 180	242
P140-IV	NL415-2_4	341 738	335 658	110	259	5 311	70

(continuación)

	Ratones	Células totales	Macrófagos	Eosinófilos	neutrófilos	Linfocitos T	Linfocitos B
P140-IV	NL415-2_15	340 389	335 200	166	133	4790	266
OVA	NL415-2_3	1 658 393	563 095	888 525	78 637	128 136	21 766
OVA	NL415-2_5	1 098 900	331 150	626 131	45 797	95 822	25 365
OVA	NL415-2_9	1 546 822	388 693	1 022 052	68 833	67 243	25 216
OVA	NL415-2_14	1 468 429	418 191	833 452	95 942	120 843	15 380
OVA	NL415-2_19	1 064 136	302 118	624 692	80 691	56 635	24 624
P140-IN	NL415-2_6	862 995	271 110	490 306	57 542	44 036	25 606
P140-IN	NL415-2_7	942 875	322 340	497 948	60 787	61 800	32 251
P140-IN	NL415-2_10	1 120 576	247 391	737 671	62 354	73 159	26 562
P140-IN	NL415-2_11	1 592 328	538 954	839 841	95 173	118 360	23 383
P140-IN	NL415-2_16	1 377 755	436 210	792 249	47 346	101 951	33 156
P140-IN	NL415-2_20	1 028 339	286 509	615 171	65 366	61 293	13 236
P140-IV	NL415-2_12	949 720	439 265	425 928	42 783	41 744	10 219
P140-IV	NL415-2_13	780 142	442 055	272 763	21 442	43 881	15 209
P140-IV	NL415-2_17	809 921	244 523	473 105	59 616	32 677	14 027
P140-IV	NL415-2_18	895 467	293 070	470 027	76867	55 502	17 417
P140-IV	NL415-2_21	738 452	342 134	327 186	40 275	28 857	11 003
P140-IV	NL415-2_22	885 821	379 565	429 469	31 756	45 030	10 922

5 En los ratones desafiados con ovoalbúmina, el número total de células inflamatorias recuperadas en el fluido del BAL aumenta significativamente. Este efecto se relaciona con el aumento significativo del influjo de eosinófilos, neutrófilos, linfocitos T y B (### p<0,001; **Figura 13**).

10 El fosfopéptido P140 administrado por vía i.v. (4 mg/kg) disminuía significativamente el reclutamiento de eosinófilos (-50 %, *** p<0,001), linfocitos T (-66 %, ** p<0,01) y linfocitos B (-42 %, * p<0,05), así como el reclutamiento de neutrófilos (-38 %) aunque no por debajo del corte significativo. Por el contrario, cuando se administró localmente por vía i.n., el fosfopéptido P140 presenta poco efecto sobre el reclutamiento de células inflamatorias en el BAL sugiriendo que el P140 actúa mediante un efecto sistémico.

15 El proyecto animaba a estudiar si el fosfopéptido P140 podía tener un efecto antiinflamatorio administrado localmente por vía i.n. o sistémicamente por vía i.v. en un modelo de hipereosinofilia de vías aéreas de 15 días en ratones Balb/c sensibilizados y desafiados con ovoalbúmina. Los inventores compararon el efecto del P140 administrado por vía i.n. o i.v. 2 días antes del desafío con OVA o solución salina, es decir, 6 días antes de la recuperación de células inflamatorias de las vías aéreas mediante lavado broncoalveolar.

20 Por lo tanto, la administración i.v. (4 mg/kg) de P140 demostraba un efecto antiinflamatorio en este modelo de hipereosinofilia de vías aéreas frente a OVA en ratones Balb/c, mientras que la administración i.n. se mantiene sin un efecto sustancial. Esto sugiere que la actividad antiinflamatoria de P140 es por un efecto sistémico (por ejemplo, de bazo, órganos linfoides, médula ósea) más que local.

20 **Ejemplo 6. Estudio del efecto del péptido P140 en un modelo de ratón de inflamación de colon (modelo de DSS inducida).**

Los ratones normales (C57BL/6; machos; de 7 semanas de edad) recibieron el péptido P140 (100/inyección, vía iv; 10 ratones) o solo solución salina (grupo de control; 10 ratones) los días -2 y -1. El día 0, se administró dextrano sulfato sódico (DSS; al 2-3 %) para inducir la enfermedad.

25 Los animales se examinaron cada día en cuanto a la pérdida de peso corporal, consistencia de las heces, diarrea y sangre en las heces. Los animales se sacrificaron alrededor del día 14 o en cualquier momento si estaban muy enfermos (pérdida de > 25 % de peso corporal). Estadísticas: Mann-Whitney (exacto)

30 Poca diferencia en el DAI (p = 0,5386). Sin embargo, este índice clínico no se adapta muy bien al modelo de ratón. Había un aumento significativo del tamaño del colon, reflejando una disminución de la inflamación (p = 0,0011). No se observó una diferencia del peso corporal entre los dos grupos. Sin embargo, había una tendencia el día +3 y día +4. La sangre aparecía en las heces el día +6 en los grupos de control frente al día +8 solo en el grupo de P140.

35 **Ejemplo 7. Efecto del fosfopéptido P140 en un modelo de 31 días de inflamación eosinofílica de las vías aéreas inducida por extracto de ácaros del polvo doméstico (HDM) en ratones.**

El objetivo de este estudio era evaluar el efecto del fosfopéptido P140 administrado por vía sistémica (intravenosa) en un modelo de 31 días de asma inducida por HDM en ratones. El fosfopéptido P140 se solubilizó en agua estéril (Braun) y se añadió solución salina estéril concentrada 10x para ajustar la osmolaridad a 300 mosm. La osmolaridad se

controló con un micro osmómetro (Löser, tipo 15) y se validó (303 mosm). El fosfopéptido P140 se utilizó *in vivo* a la dosis de 4 mg/kg por vía intravenosa (i.v.). Los animales de control recibieron volúmenes equivalentes (2 ml/kg) de solución salina (Tabla 8).

Tabla 8

Grupo número	Número de ratones	Tratamiento	Desafío (D ₂₈ -D ₃₀)
1	6	Disolvente	S. salina
2	5	P140 (i.v.) 4 mg/kg	S. salina
3	8	Disolvente	HDM
4	8	P140 (i.v.) 4 mg/kg	HDM

5 Se sensibilizaron ratones Balb/c machos de nueve semanas de edad mediante administración intranasal (i.n.) de extracto de HDM (Stallergenes): 1 µg en 25 µl de solución salina los días 0, 1, 2, 3, 4, y 10 µg los días 14 y 21. Los ratones se desafiaron mediante administración i.n. de HDM (1 µg) y/o solución salina los días 28, 29 y 30. Los ratones se trataron mediante inyección i.v. (2 ml/kg) de P140 o el disolvente el día 25 (véase la **Figura 14**).

10 Respuesta de vías aéreas a la Metacolina (Flexivent®). El día 31, se evaluaron las respuestas en las vías aéreas al PBS y luego a metacolina utilizando una técnica de oscilación forzada (Flexivent®, SCIREQ, Montreal, Canadá), como se había descrito (Daubeuf y col, Bioprotocol, 645, 2013). Los ratones se anestesiaron con una inyección intraperitoneal de xilazina (Rompun®; 1 mg/kg), seguido quince minutos después por una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (3,64 mg/kg). La tráquea se expuso y se insertó una aguja metálica de calibre 18 en la tráquea.
 15 Las vías aéreas se conectaron a un ventilador de pequeños animales controlado por computadora, y se entilaron casinusoidalmente con un volumen tidal de 10 ml/kg a una frecuencia de 150 respiraciones/min y una presión espiratoria final positiva de 2 cm de H₂O para conseguir un volumen respiratorio medio cercano al de la respiración espontánea. Después de la medición de la línea basal, cada ratón se desafió durante 10 s con un aerosol de PBS generado con un nebulizador en el tubo y se administró directamente a través del ventilador. Luego, se administró metacolina (MCh) aerosolizada a 50 mg/ml durante 10 s. El efecto de la metacolina se calculó como el pico de la respuesta, es decir, la
 20 media de tres valores máximos integrados para el cálculo de la resistencia de vías aéreas (R, cm H₂O.s.ml⁻¹), elasticidad (E, cm H₂O.ml⁻¹) y distensibilidad (C, ml.cm H₂O⁻¹).

25 Se llevó a cabo el BAL después de la medición de la respuesta de las vías aéreas veinticuatro horas después del desafío con HDM como se había descrito (Daubeuf y col. 2012). Los ratones se anestesiaron IP (Ketamina 150 mg/kg - Xilazina 10 mg/kg). La sangre se recolectó del corazón, se centrifugó a 10.000 g durante 2 min y se almacenó el suero a -20 °C.

30 Después de la semi-escisión de la tráquea, se insertó una cánula de plástico y el espacio aéreo se lavó con 0,5 ml de NaCl al 0,9 % inyectados con una jeringa de 1 ml. Este procedimiento se llevó a cabo 10 veces. El sobrenadante inicial concentrado de los 2 primeros lavados (volumen = 2 x 0,5 ml administrado, aproximadamente 0,5 ml recuperado) se recolectó para las mediciones de citocinas. El fluido del BAL restante se centrifugó (300 g durante 5 min, 4 °C), y se agruparon los aglomerados celulares. El aglomerado celular se suspendió en 500 µl de NaCl al 0,9 % y se utilizó para el recuento celular total en un Analizador Celular Muse® (Millipore). Los recuentos celulares diferenciales se evaluaron por citometría de flujo (citómetro LSRII®, BD Bioscience). Las células del BAL se añadieron con FCblock (0,5 µl, 553142, BD Bioscience) en una microplaca negra, y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Entonces,
 35 se añadieron los anticuerpos marcadores: CD11c-FITC (557400, BD bioscience), Gr-1-PeeFluor610 (61-5931-82, eBioscience), F4/80-PE (12-4801-82, eBioscience), CD11b-APC-Cy7 (557657, BD bioscience), CD45-AlexaFluor700 (103128, BioLegend), CD3-BV605 (564009, BD bioscience), CD19-PE-Cy7 (552854, BD bioscience). Los anticuerpos se incubaron con las células del BAL durante 30 min a temperatura ambiente antes de la adición de DAPI (5 µl, BD bioscience), y se llevó a cabo la citometría inmediatamente.

40 Todos los ratones se sensibilizaron al HDM los días 0, 1, 2, 3, 4, 14, 21, y se desafiaron con solución salina (asma crónica) o HDM (desafío con el alérgeno). Los datos se presentan como las medias ± SEM. Las diferencias entre los grupos se ensayaron en cuanto a la significación estadística utilizando un ensayo t de Student en cuanto a células inflamatorias y un ANOVA de dos vías seguido por un post-ensayo de Bonferroni en cuanto a las respuestas de vías aéreas. Los datos se consideraron significativamente diferentes cuando p≤0,05.

Tabla 9

Ratones		Células totales	Macrófagos	Eosinófilos	neutrófilos	Linfocitos T	Linfocitos B	CD
NL715-3	Ctrl	979000	189 476	355 097	20 526	207 329	17 702	454
NL715-26	Ctrl	767000	25 288	403 090	12 409	267 950	33 315	301
NL715-30	Ctrl	386000	25 101	205 264	3 229	109 936	17 394	156
NL715-33	Ctrl	788000	7 433	443 543	96 949	178 871	34 094	0
NL715-35	Ctrl	913000	9 396	500 534	139 632	202 210	51 609	270

(continuación)

Ratones		Células totales	Macrófagos	Eosinófilos	neutrófilos	Linfocitos T	Linfocitos B	CD
NL715-37	Ctrl	801000	12 384	384 299	145 765	222 421	23 747	222
NL715-1	P140	448000	130 734	124 514	2 584	57 711	2 297	0
NL715-5	P140	1390000	267 885	450 346	35 734	323 623	44 688	484
NL715-8	P140	1510000	360 987	448 074	23 986	294 011	22 879	461
NL715-11	P140	815000	177 815	205 568	34 836	208 439	11 101	319
NL715-25	P140	484000	73 725	239 527	2 394	86 810	7 660	160
NL715-4	HDM	2210000	90 204	1 054 534	438 909	507 196	29 645	231
NL715-6	HDM	1810000	63 322	842 282	396 394	372 799	72 101	329
NL715-9	HDM	2330000	73 284	1 312 253	365 962	444 121	62 314	457
NL715-12	HDM	2190000	118 970	976 204	344 747	543 880	87 229	1 390
NL715-14	HDM	3077000	89 870	1466 110	663 136	573 814	193 834	915
NL715-28	HDM	1470000	70 438	561 204	379 937	355 637	32 838	493
NL715-38	HDM	3500000	185 702	1 850 328	73 656	1 076 717	124 546	4018
NL715-38	HDM	2430000	94 477	1 325 575	33 515	776133	106 880	1 056
NL715-2	HDM+P140	2140000	58 705	955 824	606 700	400 329	59 092	1 034
NL715-7	HDM+P140	2992000	118 771	1 404 942	510 027	735 865	102 246	2 238
NL715-10	HDM+P140	2190000	314 326	636 065	500 004	383 074	42 085	1 793
NL715-13	HDM+P140	1010000	126 002	342 046	147 616	243 813	25 443	242
NL715-27	HDM+P140	2310000	34 364	1 283 190	371 317	469 834	116 814	586
NL715-29	HDM+P140	2220000	38 709	1 036 803	487 119	502 985	115 000	1 350
NL715-31	HDM+P140	1270000	29 121	538 210	284 503	334 784	53 947	733
NL715-34	HDM+P140	2410000	73 491	1 010 666	24 426	1 056 303	170 980	1 928

Ratones		Rrs		Grs		Ers	
		cm H ₂ O.s/ml		ml/cm H ₂ O		cm H ₂ O/ml	
NL715-3	Ctrl	0,7599	4,7857	0,0586	0,0270	17,0739	38,9111
NL715-30	Ctrl	0,4788	4,5462	0,0598	0,0172	16,7201	62,7641
NL715-33	Ctrl	0,8317	8,8241	0,0466	0,0079	21,5098	147,5663
NL715-35	Ctrl	0,5620	9,2466	0,0536	0,0053	18,6679	233,9273
NL715-37	Ctrl	0,8316	11,2979	0,0501	0,0083	19,9557	143,6106
NL715-1	P140	0,5590	4,1067	0,0545	0,0304	18,3671	33,3720
NL715-5	P140	0,8945	9,4002	0,0498	0,0132	20,0811	84,9688
NL715-8	P140	0,5926	2,2229	0,0569	0,0380	17,5777	26,3200
NL715-11	P140	0,8074	4,0926	0,0541	0,0238	18,4893	42,4174
NL715-25	P140	0,4418	2,1844	0,0650	0,0370	15,3975	28,6047
NL715-4	HDM	1,0205	9,0924	0,0537	0,0081	18,6618	128,4742
NL715-6	HDM	0,9134	5,3264	0,0452	0,0099	21,0856	173,5847
NL715-9	HDM	0,5742	8,4096	0,0537	0,0141	18,6092	104,8681
NL715-12	HDM	0,8239	9,3617	0,0528	0,0056	18,9503	224,6403
NL715-14	HDM	0,6807	7,4437	0,0493	0,0103	20,2677	156,8403
NL715-28	HDM	0,6958	5,0333	0,0533	0,0126	18,7594	87,2749
NL715-36	HDM	0,9430	14,8440	0,0573	0,0051	17,5010	214,1691
NL715-38	HDM	0,7308	8,7652	0,0538	0,0152	18,5827	71,7470
NL715-2	HDM+P140	0,8405	5,6421	0,0554	0,0146	18,0582	79,8018
NL715-7	HDM+P140	0,6092	10,3886	0,0514	0,0075	19,4433	148,4985
NL715-10	HDM+P140	0,7972	11,9654	0,0528	0,0062	18,9515	188,1151
NL715-13	HDM+P140	0,5185	10,5419	0,0566	0,0065	17,6781	219,9720
NL715-27	HDM+P140	0,6804	8,8810	0,0492	0,0101	20,3326	125,7688
NL715-29	HDM+P140	0,6385	13,0087	0,0458	0,0060	21,8367	173,4582
NL715-31	HDM+P140	0,4744	7,0705	0,0552	0,0138	18,1106	72,6033
NL715-34	HDM+P140	0,5458	9,7688	0,0589	0,0081	16,9723	131,8035

Respuestas de vías aéreas en asma crónica

- 5 La inhalación de PBS no tenía efecto sobre la línea basal de resistencia, elasticidad y distensibilidad de la vía aérea evaluadas por la técnica Flexivent® en ratones desafiados con solución salina, tratados con disolvente (**Figura 15A-C**). El tratamiento con P140 (i.v., 4 mg/kg, día 25) tampoco tenía efecto sobre ningún parámetro en comparación con

los ratones tratados con disolvente (**Figura 15A-C**). Sin embargo, la inhalación de metacolina (50 mg/ml) inducía un marcado aumento de la resistencia y elasticidad de la vía aérea acompañado por una disminución de la distensibilidad (**Figura 15A, B y C, respectivamente**) en los ratones desafiados con solución salina, tratados con disolvente. El tratamiento con P140 disminuía significativamente la elasticidad (un -65 % * $p < 0,05$) y aumentaba la distensibilidad de la vía aérea (un +115 %, * $p > 0,05$) en comparación con el grupo de disolvente (**Figura 15**), así como una disminución de la resistencia de la vía aérea (un -42 %) aunque no significativamente ($n = 5$).

Respuesta de vías aéreas en ratones desafiados con alérgeno (HDM)

La inhalación de PBS no tenía efecto sobre la línea basal de resistencia, elasticidad y distensibilidad de la vía aérea evaluadas en ratones desafiados con HDM, tratados con disolvente. El tratamiento con P140 no tenía efecto sobre la resistencia, elasticidad o distensibilidad de vías aéreas en ratones desafiados con alérgeno en comparación con el grupo de disolvente. Sin embargo, la inhalación de metacolina inducía aumentos significativos de la resistencia y elasticidad de vías aéreas acompañados por una disminución de la distensibilidad en ratones desafiados con HDM, tratados con disolvente (**Figura 15**).

Efecto en asma crónica (ratones sensibilizados con HDM, desafiados con solución salina)

Se recuperaron eosinófilos ($3,8 \times 10^5$), neutrófilos ($0,7 \times 10^5$), macrófagos ($0,4 \times 10^5$), linfocitos T y B ($1,9 \times 10^5$ y $0,3 \times 10^5$), y células dendríticas ($0,2 \times 10^3$) en el fluido del BAL en el desafío con solución salina en ratones tratados con disolvente (**Figura 16**). El tratamiento con P140 (4 mg/kg, i.v., día 25) disminuía significativamente el número de neutrófilos (un -71 %, * $p < 0,05$), así como de eosinófilos (un -25 %) y linfocitos B (un -40 %) aunque no significativamente, y aumentaba significativamente el número de macrófagos unas 4,5 veces (* $p < 0,05$) en comparación con el grupo de disolvente (**Figura 16**).

Efecto en ratones desafiados con alérgeno (sensibilizados con HDM y desafiados con HDM)

El número de células inflamatorias recuperadas en el fluido del BAL en los ratones desafiados con HDM aumentaba significativamente en comparación con el asma crónica (desafiados con solución salina) (Figura 2). Este efecto se relacionaba con un aumento significativo del flujo de eosinófilos ($11,7 \times 10^5$, ### $p < 0,001$), neutrófilos ($3,4$, # $p < 0,05$), linfocitos T y B ($5,8 \times 10^5$ y $0,9 \times 10^5$, # $p < 0,05$) (**Figura 16**) en respuesta al desafío con HDM. Así, el tratamiento con P140 no presentaban efectos sobre el reclutamiento de células inflamatorias en el BAL de ratones desafiados con HDM en comparación con el grupo de disolvente.

El objetivo de este estudio era evaluar si el fosfopéptido P140 podía tener un efecto antiasmático cuando se administra sistémicamente en un modelo de asma de 31 días en ratones Balb/c sensibilizados con extractos de ácaros del polvo doméstico (HDM). El P140 se administró por vía i.v. en ratones sensibilizados con HDM, 2 días antes del desafío con HDM o solución salina, es decir, 6 días antes de la evaluación de las respuestas de vías aéreas a la MCh y la recuperación de células inflamatorias de las vías aéreas en el lavado broco alveolar.

Los inventores escogieron diseñar el estudio sensibilizando todos los animales a HDM como i) un modelo de asma crónica cuando los animales se desafiaron además con solución salina (ratones sensibilizados con HDM, desafiados con solución salina), y ii) un modelo de ataque de asma inducido por un desafío con alérgeno, cuando los animales se desafiaban adicionalmente con HDM (ratones sensibilizados con HDM, desafiados con HDM). Es decir, el diseño del protocolo podría demostrar el efecto del P140 i) en asma crónico diario, así como ii) durante una crisis de asma.

En los ratones con asma crónica (sensibilizados con HDM y desafiados con solución salina) la Metacolina inducía un gran aumento de la obstrucción de las vías aéreas medida como aumentos de la resistencia (R) y elasticidad (E) de vías aéreas y una disminución de la distensibilidad (C). En comparación con los valores normales que los inventores utilizaron como control, los ratones Balb/c no sensibilizados y no desafiados (línea basal de R, E y C) estos valores son representativos de la hiper-respuesta de vías aéreas en estos ratones con asma crónica. Los inventores mostraron que el tratamiento con P140 disminuía significativamente las respuestas de las vías aéreas a la MCh con una disminución significativa de la elasticidad E de vías aéreas y un aumento de la distensibilidad C, así como una disminución de la resistencia R de la vía aérea, aunque no significativa en comparación con el grupo tratado con disolvente. Esto sugiere que el P140 disminuye la hiper-respuesta de las vías aéreas observada en el modelo de asma crónica alérgica de los inventores.

Además, los inventores observaron en este estudio el efecto del tratamiento con P140 sobre la reacción inflamatoria existente en las vías aéreas en el asma crónica. El modelo de los inventores de asma crónica se caracteriza por infiltración de eosinófilos, neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfocitos T y B. El tratamiento con P140 inducía una disminución significativa del número de neutrófilos recuperados en el lavado broncoalveolar, así como de eosinófilos y linfocitos B, aunque no significativamente, y un aumento significativo de macrófagos en comparación con los ratones tratados con disolvente. El asma se conoce como una inflamación eosinofílica de las vías aéreas. De manera más importante, el asma incontrolada difícil se describe como una enfermedad inflamatoria de las vías aéreas con un cambio en el fenotipo de las células inflamatorias infiltradas, de manera más importante con infiltración de neutrófilos en las vías aéreas. Este fenotipo a menudo es resistente al tratamiento con glucocorticoides. Por lo tanto, el efecto que se observa con el fosfopéptido P140 sugiere que el P140 tiene un potencial antiasmático en el asma crónica, sobre las hiper-respuesta de vías aéreas, así como la inflamación de las vías aéreas.

Sin estar ligados por teoría alguna en particular, el P140 parece que aumenta la resolución de la inflamación crónica, en particular por neutrófilos, que existen en las vías aéreas en el asma, acompañado por la resolución de la hiper-respuesta de vías aéreas que es uno de los síntomas más incapacitante de los pacientes de asma. En ratones desafiados con el alérgeno (sensibilizados con HDM y desafiados con HDM), el HDM inducía un aumento adicional de la hiper-respuesta de vías aéreas y del infiltrado de células inflamatorias en vías aéreas recuperado en el BAL. Sin embargo, el tratamiento con P140 tenía poco efecto sobre este aumento de la hiper-respuesta a la MCh de las vías aéreas inducida por el alérgeno ni sobre el reclutamiento de células inflamatorias en el BAL. Esto indica que el tratamiento con P140, cuando se administra 2 días antes del desafío con alérgeno no es tan potente para el bloqueo de la reacción de una crisis de asma, aunque los niveles basales de la respuesta de vías aéreas asmáticas y la inflamación en ausencia de desafío con HDM estaban reducidos.

La administración sistémica de P140 (4 mg/kg i.v.), 2 días antes del desafío con solución salina, tenía el potencial para restaurar la respuesta de vías aéreas a la línea basal, y resolver la inflamación en el asma crónica diaria. Por el contrario, en las condiciones utilizadas para la administración de P140, es decir, 2 días antes del desafío con HDM, el P140 no tenía efecto sobre las consecuencias del desafío con alérgeno, indicando que no mejoraba ni empeoraba el efecto del alérgeno en las vías aéreas sensibilizadas. Dicha actividad de P140 medida en el modelo de 31 días de asma indica que el P140 podría ser eficaz en el asma crónica. Aumentando el retraso entre el tratamiento de P140 y el desafío con el alérgeno podría permitirse un aumento de la actividad del P140 en el asma. Los inventores anticiparon que el P140 podía prevenir la hiper-respuesta de las vías aéreas, así como la inflamación causada por el contacto repetido con el alérgeno, es decir, resolver los síntomas del asma crónica diaria.

Ejemplo 8. Efecto del péptido P140 sobre el modelo de rata de polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica

La polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP) es una enfermedad inflamatoria mediada autoinmunitaria del sistema nervioso periférico (SNP) para la cual las terapias son limitadas/no existen. Recientemente, un nuevo modelo animal para CIDP, la EAN crónica, se ha caracterizado (Brun S, Beaino W, Kremer L, Taleb O, Mensah--Nyagan AG, Lam CD, Greer JM, De Seze J, y Trifilieff T (2015). Characterization a new rat model for chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathies. J. Neuroimmunol. 278: 1-10). Este modelo cumple los criterios electrofisiológicos de la desmielinización con degeneración axonal, confirmada por inmunohistopatología. La fase tardía de la enfermedad crónica se caracterizaba por la acumulación de células positivas a citocina IL-17 y macrófagos en los nervios ciáticos y por altos niveles de IL-17 en el suero. Es un modelo animal fiable y reproducible para CIDP, que se puede utilizar para estudios traducionales para enfermedades inflamatorias mediadas autoinmunitarias humanas crónicas del SNP, y particularmente la CIDP, para la cual exista una necesidad crucial de nuevas inmunoterapias direccionadas. Por lo tanto, este estudio buscaba investigar el posible efecto del péptido P140 en este nuevo modelo preclínico en rata para la CIDP.

Se utilizaron ratas Lewis macho de 7-8 semanas de edad, con un peso de 250-270 g adquiridas en Charles River (Domaine des Oncins, L'Arbresle, Francia). Para inducir la EAN crónica (CIDP), se inmunizaron las ratas con el péptido S-palm-P0(180-199) mediante inyección subcutánea en la base de la cola de 200 µl de un inóculo que contenía 200 µg de péptido (Ac(palm)KR-GRQTPVLYAMLDHSRS), y 0,5 mg de *Mycobacterium tuberculosis* (cepa H37 RA, Difco, Detroit, Michigan, USA) emulsionados en 100 µl de solución salina y 100 µl de adyuvante incompleto de Freund (SIGMA-Aldrich, St-Quentin Fallavier, Francia).

Se evaluaron el peso corporal y las valoraciones clínicas diariamente hasta los 60 días post-inmunización (dpi). La gravedad de la paresia se graduó de la siguiente manera: 0 = sin enfermedad; 1 = cola flácida; 2 = paraparesia moderada; 3 = paraparesia grave; 4 = tetraparesia; 5 = muerte.

Se utilizaron un total de 15 ratas y se trataron como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 10

Número de ratas	Emulsión inyectada el día 0	Denominación	Tratamiento
4	S-palm P0(180-199) + CFA	CIDP de control	-
7	S-palm P0(180-199) + CFA	CIDP tratada	P140

Se inyectaron por vía intraperitoneal 100 µg/rata de péptido P140 en 500 µl de agua/solución salina (1:10) a los 5, 7, 9, 13 dpi y 3 veces por semana desde el 22 dpi hasta el final del estudio.

a) ELISA de citocinas

Los sueros de las ratas tratadas y no tratadas se recolectaron a los 18, 40 y 60 dpi. La concentración de citocina IL-17 se medirá por duplicado en sueros sin diluir utilizando kits de ELISA comerciales específicos para la IL-17 de rata (eBioscience, San Diego, CA, USA), según las instrucciones de los fabricantes.

b) ELISA de los anticuerpos

Los sueros de ratas tratadas y no tratadas también se ensayarán a los 18, 40 y 60 dpi en cuanto a la presencia de anticuerpos anti-P0(180-199) utilizando ELISA. Los péptidos se revestirán en placas de 96 pocillos a 20 µg/ml en una solución tampón de carbonato-bicarbonato 0,05 M (pH 9,6, 100 µl/pocillo) y se incubaron durante una noche a 4 °C. Las placas se lavarán entonces con solución salina tampón de fosfato (PBS) y se bloqueó con un 1 % de seroalbúmina bovina en PBS durante 1 h a 37 °C. Después del lavado, los sueros (100 µl/pocillo) diluidos a 1/5000 se añadirán por duplicado y se incubarán durante 2 h a 37 °C. Después del lavado, las placas se incubarán con anti-IgG de rata de cabra acoplados a peroxidasa (1:2000, SIGMA-Aldrich) durante 2 h a 37 °C. Después de un lavado extenso, cada pocillo se incubará con 75 µl de TMB a temperatura ambiente hasta el desarrollo del color. La reacción se parará mediante la adición de 1 M de H₂SO₄ (25 µl/pocillo).

10 c) Inmunohistoquímica

Para evaluar la infiltración de células inflamatorias y los cambios patológicos en el SNP, las ratas tratadas y no tratadas se sacrificaron a los 60 dpi. Las ratas se anestesiaron profundamente con Ketamina/Rompun y se perfundieron por vía intracardiaca con paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) a 4 °C en PBS. Se disecaron los nervios ciáticos y la cauda equina, se fijaron en Bouin y se embebieron en parafina.

15 Después de desecarlo, se calentarán secciones transversales (de 5 µm) a 80 °C durante 10 min en tampón de citrato. La peroxidasa endógena se inhibió con un 0,02 % de H₂O₂ en agua durante 10 min. Los sitios de unión no específica se bloquearán con un 5 % de suero fetal bovino (Gibco Invitrogen, Camarillo, CA, USA) en PBS durante 30 min y luego con los siguientes anticuerpos monoclonales anti-MBP (1:500; de producción casera) para la mielina; SMI-311 (1:1000; Abcam, Paris, Francia) para los neurofilamentos; ED1 (1:400; Serotec, Oxford, UK) para los macrófagos y la interleucina-17 (IL-17; 1:100; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). La unión de los tejidos a las secciones de tejido se visualizarán con un anti-IgG de ratón biotinilado (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) y complejo Avidina-Biotina (kit de peroxidasa ABC; Vectastain®, Vector Laboratories), seguido por el desarrollo con el sustrato DAB (Vector® DAB SK-4100, Vector Laboratories) para la IL-17, y sustrato VIP (Vector® VIP SK-4600, Vector Laboratories) para otros anticuerpos.

25 El péptido P140 presenta un efecto sobre la gravedad de la enfermedad en la CIDP de ratas y elimina la cronicidad. Para examinar el efecto del péptido P140 sobre la CIDP de las ratas, los animales se trataron con P140 (100 µg/rata) por vía intraperitoneal a los 5, 7, 9, 13 dpi y 3 veces por semana desde el 22 dpi hasta el final del estudio. La **Figura 17A** muestra la evolución del peso durante el curso de la enfermedad con una pérdida máxima de peso correspondiente a las máximas valoraciones clínicas de la enfermedad. Esta pérdida de peso es menos importante en el grupo tratado en comparación con las ratas sin tratar. Como se muestra en la **Figura 17B** el tratamiento de P140 no solo retrasaba la aparición de la enfermedad y disminuía las valoraciones clínicas máximas en comparación con las ratas sin tratar, sino que también parecía eliminar la cronicidad de la enfermedad.

Ejemplo 9. Estudio del efecto del péptido P140 en un modelo murino del síndrome de Gougerot-Sjögren, el ratón MRL/lpr (enfocándose en las glándulas salivares)

35 En este estudio, se utilizaron ratones MRL/lpr hembra de 11-12 semanas de edad con 10 ratones por grupo para el análisis estadístico. Cada ratón recibió una única inyección por vía retro-orbital, 100 µg de péptido P140 de 100 µl en un 9‰ de NaCl. Después de 5 días, se recolectó la sangre de los ratones en un tubo heparinizado y se retiraron las glándulas salivares (GSS) y se colocaron en tubos de Eppendorf que contenían PBS, pH 7,4.

Los efectos del péptido P140 se habían estudiado en varios sistemas.

40 Estudio de celularidad en sangre periférica: Se lisaron 300 µl de sangre del ratón en 3 ml de DAKO EasyLyse (ref. S2364) de acuerdo con el protocolo proporcionado por el proveedor (Procedimiento B). Después de dos lavados en PBS pH 7,4 - 2 % (v/v) de suero fetal bovino, las células se llevaron a 300 µl del mismo tampón. Las células se contaron en una celda Malassez en presencia de Azul Turc para diferenciar los leucocitos de los glóbulos rojos sanguíneos restantes. Los inventores dedujeron un número de células por ml de sangre para compararlo entre los diferentes grupos de tratamiento para ver si el péptido P140 induce una variación en la cantidad de leucocitos en la sangre.

Preparación para el criostato de órganos

Las glándulas salivares (SG) se lavaron en PBS pH 7,4 y luego se colocaron en una copa dedicada a la preparación de secciones de criostato. La copa se cargó con medio "OCT" (Cell path, ref. 03803126) hasta que se cubre completamente el tejido. La copa se sumerge entonces en nitrógeno líquido y luego se almacena a -80 °C hasta su uso.

El tejido se cortó en secciones de criostato de 5 micrómetros. Las secciones se dejaron a temperatura ambiente durante una noche (12 horas). Al día siguiente las secciones se incubaron en acetona al 100 % durante 30 minutos. Las secciones se almacenaron entonces a -80 °C para su uso posterior. Las secciones se rehidrataron entonces en PBS pH 7,4, cinco minutos antes de la inmunotinción.

55 Inmunotinción:

El protocolo es el siguiente:

Se incuban las secciones en PBS-2 % (p/v) de BSA durante 30 minutos.

Se lava dos veces durante 5 minutos con los cortes PBS pH 7,4.

5 Se diluye el anticuerpo de interés, normalmente a 1/200 en PBS-2 % de BSA y se incuba directamente sobre las secciones durante 2 horas a temperatura ambiente (o una noche a 4 °C).

Se lava tres veces durante 10 minutos con PBS pH 7,4.

Se lleva a cabo la tinción nuclear con DAPI diluido 1/5000 en PBS durante 15 minutos.

Se lava tres veces durante 10 minutos con PBS pH 7,4.

Las secciones se fijan con paraformaldehído (PFA) al 4 % (v/v) durante 20 minutos.

10 Se retira el exceso de PFA y luego se monta el cubreobjetos sobre el portaobjetos con el "medio de montaje DAKO" y se deja secar durante 2 horas a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Se visualiza en el microscopio.

Marcado con hematoxilina/eosina:

15 El número de sitios de focos (FS) se determinó para cada ratón. Un foco se define como un agregado de 50 o más células.

El nivel de inflamación de la SG se determinó semi-cuantitativamente por un sistema de valoración (escala de 0-3):

Grado 0: sin células inflamatorias; Grado 1: pocos infiltrados inflamatorios perivasculares y periductales (<100 células);

Grado 2: número moderado de infiltrados inflamatorios perivasculares y periductales (100-500 células); Grado 3:

extensa inflamación con amplios focos inflamatorios (>500 células).

20 Estudio de glándulas salivares por citometría de flujo

Las células del total de glándulas salivares teñidas fluorescentemente se marcaron con anticuerpos durante 40 min a 4 °C. Los datos se recolectaron mediante FACSCalibur.

Tabla 11

Anticuerpos	Referencias
CD3-FITC	BD-553062
CD4-FITC	BD-557307
CD8-PercP cy5.5	BD-551162
CD19-PE	BD-553786
CD45-APC	BD-559864
CD45R (B220)-PercP	BD-553093
TCR $\gamma\sigma$ -APC	eBioscience-17-5711
TCR β -FITC	BD-553170

25 Se proporcionan los resultados del estudio de celularidad en sangre periférica.

Se midió el peso de las glándulas salivares después de la escisión. Se utilizaron DNasa (1 mg/ml) y colagenasa D (50 μ g/ml). Para digerir las glándulas salivares. El recuento total de células se evaluó después de la digestión.

En este experimento se evaluaron los ratones 5 días post-administración (una única inyección iv), el péptido P140 no tenía un efecto estadísticamente significativo sobre el peso de las SG (**Figura 18**).

30 Estudio de glándulas salivares por citometría de flujo

El tratamiento de P140 (5 días, una única inyección iv) no tenía un efecto aparente sobre el número total de células presente en las SG tratadas de ratones MRL/lpr (**Figura 18**).

35 Sin embargo, cuando se examinaron las subpoblaciones de linfocitos, se detectó que el efecto del péptido P140 era en particulares subconjuntos de linfocitos. El P140 disminuía los linfocitos T CD4+ (pero no los linfocitos T CD8+) en las SG de los ratones MRL/lpr (**Figura 18**). En experimentos preliminares (no mostrados), los inventores vieron que

los linfocitos T CD4+ eran la subpoblación celular predominante infiltrada en las SG. Estos linfocitos T son sobre todo linfocitos T + TCR-β. El péptido P140 no tenía un efecto estadísticamente significativo sobre el número total de linfocitos B.

Estudio de glándulas salivares por microscopía

- 5 Se inyectaron los ratones MRL/lpr (10 ratones por brazo) con el péptido P140 (100 µl/ratón iv). Cinco días después de la inyección los ratones se sacrificaron y las SG se recolectaron como se ha indicado anteriormente. El tejido se cortó en secciones de 5 micrómetros mediante un criostato. Las secciones se marcaron con tinción con hematoxilina/eosina que es el procedimiento que se utiliza más comúnmente en histología tisular. Se determinó el nivel de inflamación y el número de FS (**Figura 19 y 20**). Las imágenes representativas eran del grupo de muestras de control 4 y el grupo de muestras tratado (Barra 500 µm).

Los resultados muestran que tan solo a los 5 días después de una única administración del péptido P140, la infiltración linfocítica en las SG de ratones MRL/lpr se reducía significativamente.

Ejemplo 10. Efecto del péptido P140 en el modelo murino de artritis reumatoide.

- 15 La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad inflamatoria que afecta a las articulaciones. La enfermedad implica accesos de inflamación de duración e intensidad variable. En particular, produce hinchazón de articulaciones en las manos y muñecas. Están disponibles varios modelos animales de RA, habitualmente inducida. El siguiente informe reduce los resultados obtenidos en un modelo agudo de RA, a saber, el modelo de ratón K/BxN. El efecto potencial del P140 en este ratón se ha ensayado en un protocolo "curativo y un protocolo "preventivo".

- 20 Los ratones transgénicos de TCR que expresan KRN y la molécula A⁹⁷ del MHC Clase II (ratones K/BxN) desarrollan una artritis inflamatoria grave. La administración del suero de estos ratones a ratones receptores sanos produce una artritis inflamatoria durante un periodo de aproximadamente 15 días con un pico de ignición alrededor del día 7 post-inyección.

- 25 Se llevaron a cabo dos administraciones de suero de ratón de K/BxN (día 0 y día 2). La inyección de suero (100 µl/ratón) se llevó a cabo mediante inyección intraperitoneal (ip) en ratones C57BL/6 (o B6) durante 8 semanas (n = 10); ratones sin tratar (n = 10).

El péptido P140 (100 µg/100 µl; iv retro-orbital) se administró de la siguiente manera:

Tratamiento curativo: Inyección el día 1 y día 4 para guiar el pico de enfermedad inflamatoria. Tratamiento preventivo: Inyección el día -7 y el día -2. Extracción de sangre S0 (el día 0) seguida por extracciones cada seis días para disponer de suero. El estudio termina cuando la inflamación retorna a su nivel basal, alrededor del día 20 (véase la **Figura 21**).

- 30 Durante el pico de inflamación, cada día se evaluaron los animales, y se establece la valoración de la hinchazón de la articulación. Varía de 0 a 4 y se basa en la observación de la articulación del animal. En la práctica, esta valoración se da para cada pata (4 valores) y estos valores se añaden juntos para obtener una valoración general que varía de 0 a 16 (**Figura 22**).

- 35 En este experimento, la inducción de la enfermedad ha sido subóptima. Los inventores no observaron un aumento significativo de los signos clínicos de la enfermedad.

- 40 El día 2 (dos días después de la inyección del suero K/BxN, y el día de la segunda inyección de suero K/BxN), se trataron los ratones con P140 NaCl comenzaron a perder peso (un 15 y 10 %). A partir del día 5, los animales comenzaron a ganar peso: los inventores notaron una ganancia de peso del 20 % para los ratones tratados con P140 entre el día 5 y el final del estudio, mientras que los ratones de control excedían el 5 % de ganancia de peso. La diferencia era estadísticamente significativa entre estas dos curvas (ANOVA de 2 vías) (**Figura 23**).

Evolución del tamaño de las patas de los animales

- 45 Patas traseras derechas: los inventores vieron un aumento del grosor de la pata trasera desde el día 0 al día 6, con un máximo entre los días 5-6 del 30 %. Desde el día 6, este aumento se invierte y los inventores ven un retorno al normal alrededor del día 10. La diferencia era estadísticamente significativa entre estas dos curvas (ANOVA de 2 vías) (**Figura 24**).

Patatas traseras izquierdas: los inventores observan un aumento de aproximadamente un 30 % del grosor de la pata, con un pico alrededor del día 5-6, y luego un retorno al normal gradualmente desde el día 6. La diferencia era estadísticamente significativa entre estas dos curvas (ANOVA de 2 vías) (**Figura 25**).

Evolución de la valoración de inflamación

- 50 Para este experimento, las valoraciones de inflamación se calcularon de manera independiente, y cada pata (patas traseras izquierda y derecha). La valoración excede solo el 1,5 para el máximo sea en ratones tratados con P140 o ratones de control. *Para los ratones tratados las dos curvas no muestran ninguna diferencia estadísticamente

significativa en el ANOVA de dos vías (**Figura 26**).

Los resultados obtenidos durante este experimento preliminar capacitaron a los inventores para identificar algunos puntos importantes que serán muy útiles para el diseño de nuevos experimentos:

- 5 1) La inflamación era muy moderada (un pequeño aumento del tamaño de las patas, poca pérdida de peso, inflamación de valoraciones muy bajas). El modo de administración del suero K/BxN se cambiará de 100 µl de suero con 50 µl de vehículo (NaCl) a 100 µl sin vehículo.
- 10 2) Solo se examinaron las dos patas traseras del animal. Pero últimamente, se observó que las patas delanteras eran las más afectadas por la enfermedad. A continuación, se tendrán en cuenta las cuatro patas del animal para la medición del tamaño de las articulaciones en portaobjetos de pie.
- 3) En el siguiente experimento se calculará la valoración de inflamación total del animal (añadiendo la valoración individual de las cuatro patas).

Protocolo preventivo: Evolución del peso de los animales

- 15 El análisis del peso de los animales presentaba una pérdida del 5 % de peso en los ratones tratados con el P140 y de un 10 % en los ratones de control. La pérdida de peso se produce durante la fase de inicio (día 1 a día 7). Los inventores notaron un retorno ligeramente más rápido en los ratones tratados en comparación con los controles. Sin embargo, no había una diferencia estadísticamente significativa entre las dos curvas (ANOVA de 2 vías) (**Figura 27**).

Evolución del tamaño de las patas de los animales

- 20 Patas traseras derechas: aumento del tamaño de las articulaciones alrededor del 12 % en ratones tratados y de aproximadamente un 22 % en los ratones de control. Este aumento de tamaño de las articulaciones se produce entre el día 0 y el día 7 antes de un retorno al normal gradualmente. Los inventores notaron una ligera diferencia en las dos curvas, pero sin una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de 2 vías) (**Figura 28**).

- 25 Patas traseras izquierdas: aumento del tamaño de la articulación de aproximadamente un 15 % en los ratones tratados y aproximadamente del 30 % entre los ratones de control. Este aumento de tamaño de las articulaciones tiene lugar entre el día 0 y el día 7 luego se observa un retorno al normal. Los inventores están viendo un desfase de las dos curvas, pero no una diferencia estadísticamente significativa (ANOVA de 2 vías) (**Figura 29**).

- 30 Patas delanteras derechas: como con las patas traseras, la inflamación se produce entre el día 0 y el día 7, y vuelve a la normalidad después del día 7, presentando los ratones tratados una hinchazón moderada en las articulaciones de la pata delantera derecha (+ 20 %) mientras que los ratones de control sufrían un aumento de cerca del 45 %. La diferencia entre las dos curvas es estadísticamente significativa en el ANOVA de dos vías ($p = 0,0069$; **) (**Figura 30**).

- Si se compara no la totalidad de las curvas entre ellas sino día a día (ensayo t no emparejado) encuadrando el pico de ignición (entre el día 4 y el día 12: **Figura 30** y **Figura 33**), los inventores observaron un máximo de inflamación (día 7), los controles estaban más afectados por la enfermedad que los ratones tratados $p = 0,0037$; **.

- 35 Pata delantera izquierda: los ratones tratados presentaban un aumento del tamaño del 20 % en la articulación d'- y los ratones de control 'l' 45 %. La diferencia entre las dos curvas es estadísticamente significativa (ANOVA de dos vías - $p = 0,0397$; *) (**Figura 31**). Los inventores realizaron un marco de la inflamación desde las curvas del crecimiento del tamaño de las articulaciones de las patas delanteras izquierdas. En comparación con la curva previa (**Figura 30**), está entre el día 3 y el día 10.

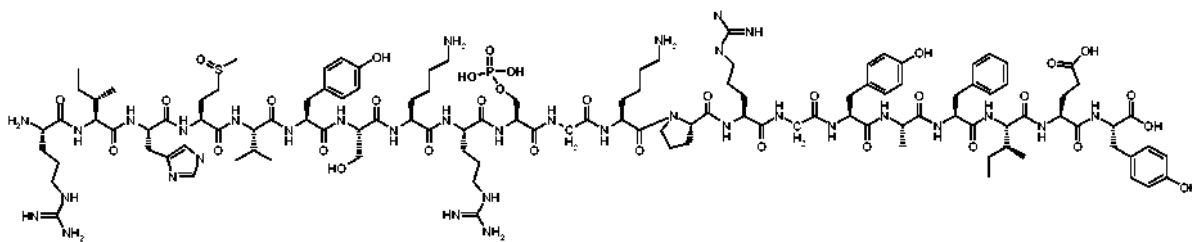
- 40 Los inventores notaron que en el pico de inflamación (día 7) los controles son los ratones más afectados por los signos clínicos de la enfermedad que los ratones tratados: $p = 0,0064$; **. La representación anterior (**Figura 31** y **Figura 34**) compara diariamente el crecimiento del tamaño de las patas delanteras de los ratones tratados en comparación con los controles (ensayo t no emparejado).

Evolución de la valoración de inflamación

- 45 Se calcularon las valoraciones de inflamación de manera independiente para cada pata (patas traseras y delanteras izquierdas y derechas) y entonces se sumaron en conjunto para obtener una valoración de inflamación general para cada ratón (**Figura 32**). La valoración para los ratones de control alcanzó un máximo alrededor del día 7 mientras que en los ratones tratados no excedía del día 5. El marco que se realizó del día 4 al día 12 en ambas curvas representaba la revolución de la valoración de inflamación (**Figura 32**, y **Figura 35**). Las dos curvas eran significativamente diferentes: $p = 0,0156$; * (ANOVA de dos vías) (**Figura 32**).

- 50 En este estudio se demuestra un efecto importante del péptido P140 en el modelo K/BxN que imita la RA. Todos los signos clínicos (articulaciones hinchadas, pérdida de peso, y apariencia de la valoración de inflamación) tienden a atenuarse.

En el modelo preventivo y de una manera estadísticamente significativa, los inventores encontraron: una pérdida de peso de los ratones tratados y la vuelta a la normalidad más rápida; una inflamación más baja en las patas y una limitación de su deformación; su valoración de inflamación disminuye abruptamente cuando la inflamación está en su



la enfermedad o trastorno inmunitarios relacionados, en los que la composición se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento y en el que la composición es eficaz para tratar o mejorar al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno.

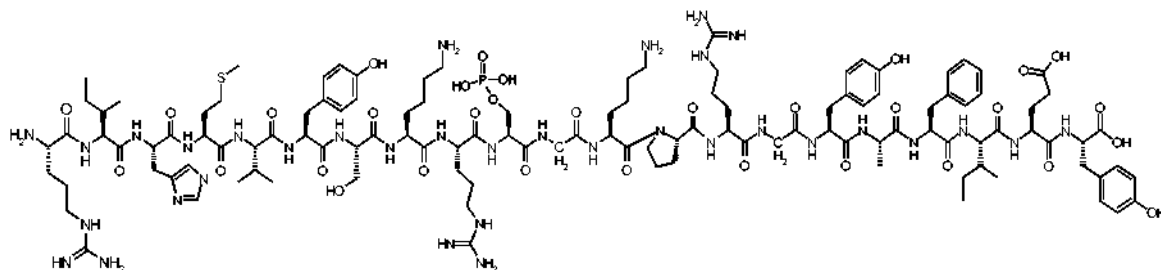
- 5 En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, la enfermedad o trastorno inmunitarios relacionados con la hiper autofagia es una enfermedad o trastorno relacionados con la autofagia mediada por hiper-chaperona (CMA).

- 10 En cualquiera de los aspectos o realizaciones, la enfermedad o trastorno relacionados con la CMA se selecciona de entre el grupo que consiste en artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), miopatías, artritis reumatoide (RA), distrofia muscular (MD), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), lupus neuropsiquiátrico, enfermedad de Crohn (CD), polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), fibromialgia, diabetes tipo II, polimiositis, enfermedad pulmonar y trombocitopenia inmunitaria crónica (ITP).

En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, la composición farmacéutica se administra a una dosis de desde aproximadamente 100 ng a aproximadamente 5 mg.

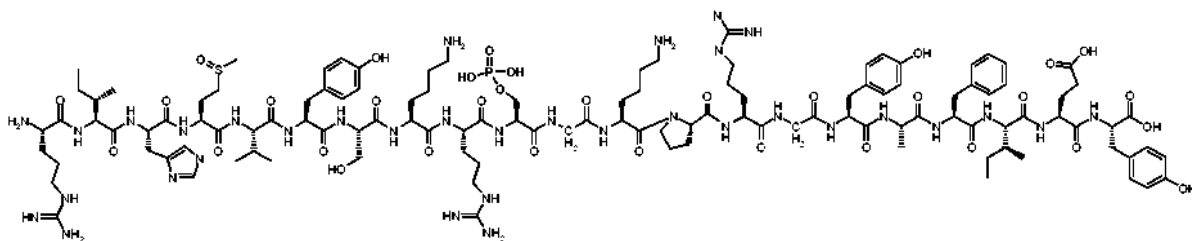
- 15 En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, la composición farmacéutica comprende un péptido liofilizado como se ha descrito en el presente documento, y un excipiente farmacéuticamente aceptable. En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, el excipiente es el manitol.

En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, el péptido tiene la estructura:



20

En cualquiera de los aspectos o realizaciones descritos en el presente documento, el péptido tiene la estructura:



LISTADO DE SECUENCIAS

- 25 <110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
 IMMUPHARMA France SA
 MULLER, Sylviane
 BRIAND, Jean-Paul
 ZIMMER, Robert
- 30 <120> PÉPTIDOS MODIFICADOS Y SU USO PARA EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS CRÓNICAS

<130> 62/091.379

<131> 14 DE DICIEMBRE DE 2014

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

5

<210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> derivado de U1 snRNP de 70 kDa

<400> 1

Arg Ile His Met Val Tyr Ser Lys Arg Ser Gly Lys Pro Arg Gly Tyr
 1 5 10 15

Ala Phe Ile Glu Tyr
 20

15

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> derivado de U1 snRNP de 70 kDa

20

<400> 2

Ile His Met Val Tyr Ser Lys Arg Ser Gly Lys Pro Arg Gly Tyr Ala
 1 5 10 15

Phe Ile Glu Tyr
 20

25

<210> 3

<211> 437

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 3

Met Thr Gln Phe Leu Pro Pro Asn Leu Leu Ala Leu Phe Ala Pro Arg
 1 5 10 15

ES 2 759 749 T3

Asp Pro Ile Pro Tyr Leu Pro Pro Leu Glu Lys Leu Pro His Glu Lys
 20 25 30
 His His Asn Gln Pro Tyr Cys Gly Ile Ala Pro Tyr Ile Arg Glu Phe
 35 40 45
 Glu Asp Pro Arg Asp Ala Pro Pro Pro Thr Arg Ala Glu Thr Arg Glu
 50 55 60
 Glu Arg Met Glu Arg Lys Arg Arg Glu Lys Ile Glu Arg Arg Gln Gln
 65 70 75 80
 Glu Val Glu Thr Glu Leu Lys Met Trp Asp Pro His Asn Asp Pro Asn
 85 90 95
 Ala Gln Gly Asp Ala Phe Lys Thr Leu Phe Val Ala Arg Val Asn Tyr
 100 105 110
 Asp Thr Thr Glu Ser Lys Leu Arg Arg Glu Phe Glu Val Tyr Gly Pro
 115 120 125
 Ile Lys Arg Ile His Met Val Tyr Ser Lys Arg Ser Gly Lys Pro Arg
 130 135 140
 Gly Tyr Ala Phe Ile Glu Tyr Glu His Glu Arg Asp Met His Ser Ala
 145 150 155 160
 Tyr Lys His Ala Asp Gly Lys Lys Ile Asp Gly Arg Arg Val Leu Val
 165 170 175
 Asp Val Glu Arg Gly Arg Thr Val Lys Gly Trp Arg Pro Arg Arg Leu
 180 185 190
 Gly Gly Gly Leu Gly Gly Thr Arg Arg Gly Gly Ala Asp Val Asn Ile
 195 200 205
 Arg His Ser Gly Arg Asp Asp Thr Ser Arg Tyr Asp Glu Arg Pro Gly
 210 215 220
 Pro Ser Pro Leu Pro His Arg Asp Arg Asp Arg Asp Arg Glu Arg Glu
 225 230 235 240
 Arg Arg Glu Arg Ser Arg Glu Arg Asp Lys Glu Arg Glu Arg Arg Arg
 245 250 255
 Ser Arg Ser Arg Asp Arg Arg Arg Arg Ser Arg Ser Arg Asp Lys Glu

ES 2 759 749 T3

	260		265		270											
	Glu	Arg	Arg	Arg	Ser	Arg	Glu	Arg	Ser	Lys	Asp	Lys	Asp	Arg	Asp	Arg
			275					280					285			
	Lys	Arg	Arg	Ser	Ser	Arg	Ser	Arg	Glu	Arg	Ala	Arg	Arg	Glu	Arg	Glu
		290					295					300				
	Arg	Lys	Glu	Glu	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Met	Ala	Glu	Pro	Ser
	305					310					315					320
	Glu	Ala	Gly	Asp	Ala	Pro	Pro	Asp	Asp	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Leu	Gly
					325					330					335	
	Pro	Asp	Gly	Pro	Asp	Gly	Pro	Glu	Glu	Lys	Gly	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg
			340						345					350		
	Glu	Arg	Arg	Arg	Ser	His	Arg	Ser	Glu	Arg	Glu	Arg	Arg	Arg	Asp	Arg
			355					360					365			
	Asp	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Asp	Arg	Glu	His	Lys	Arg	Gly	Glu	Arg	Gly
	370						375					380				
	Ser	Glu	Arg	Gly	Arg	Asp	Glu	Ala	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Asp
	385					390					395					400
	Asn	Gly	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Asp	Ser	Arg	Asp	Met	Tyr	Met	Glu
					405					410					415	
	Ser	Glu	Gly	Gly	Asp	Gly	Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Asn	Gly	Tyr	Leu	Met
					420				425					430		
	Glu	Ala	Ala	Pro	Glu											
					435											

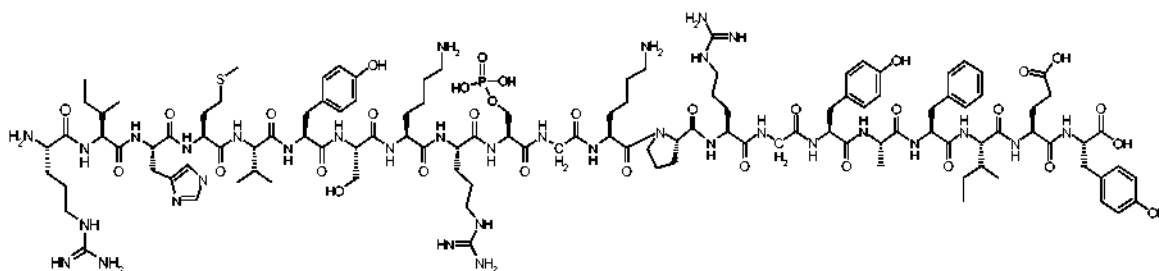
- <210> 4
- <211> 21
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> derivado de U1 snRNP de 70 kDa
- <220>
- 10 <221> MOD_RES
- <222> (4)..(4)
- <223> OXIDACIÓN
- <220>
- <221> MOD_RES
- 15 <222> (10)..(10)
- <223> FOSFORILACIÓN

ES 2 759 749 T3

	<222> (30)..(30)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<220>	
5	<221> misc_feature	
	<222> (33)..(33)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
10	<222> (39)..(39)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (42)..(42)	
	<223> n es a, c, g o t	
15	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (45)..(45)	
	<223> n es a, c, g o t	
20	<220>	
	<221> misc_feature	
	<222> (51)..(51)	
	<223> n es a, c, g o t	
	<400> 6	
	mgnathcaya tggntayws naarmgnwsn ggnarccnm gngntaygc nttyathgar	60
	taytrr	66
25		

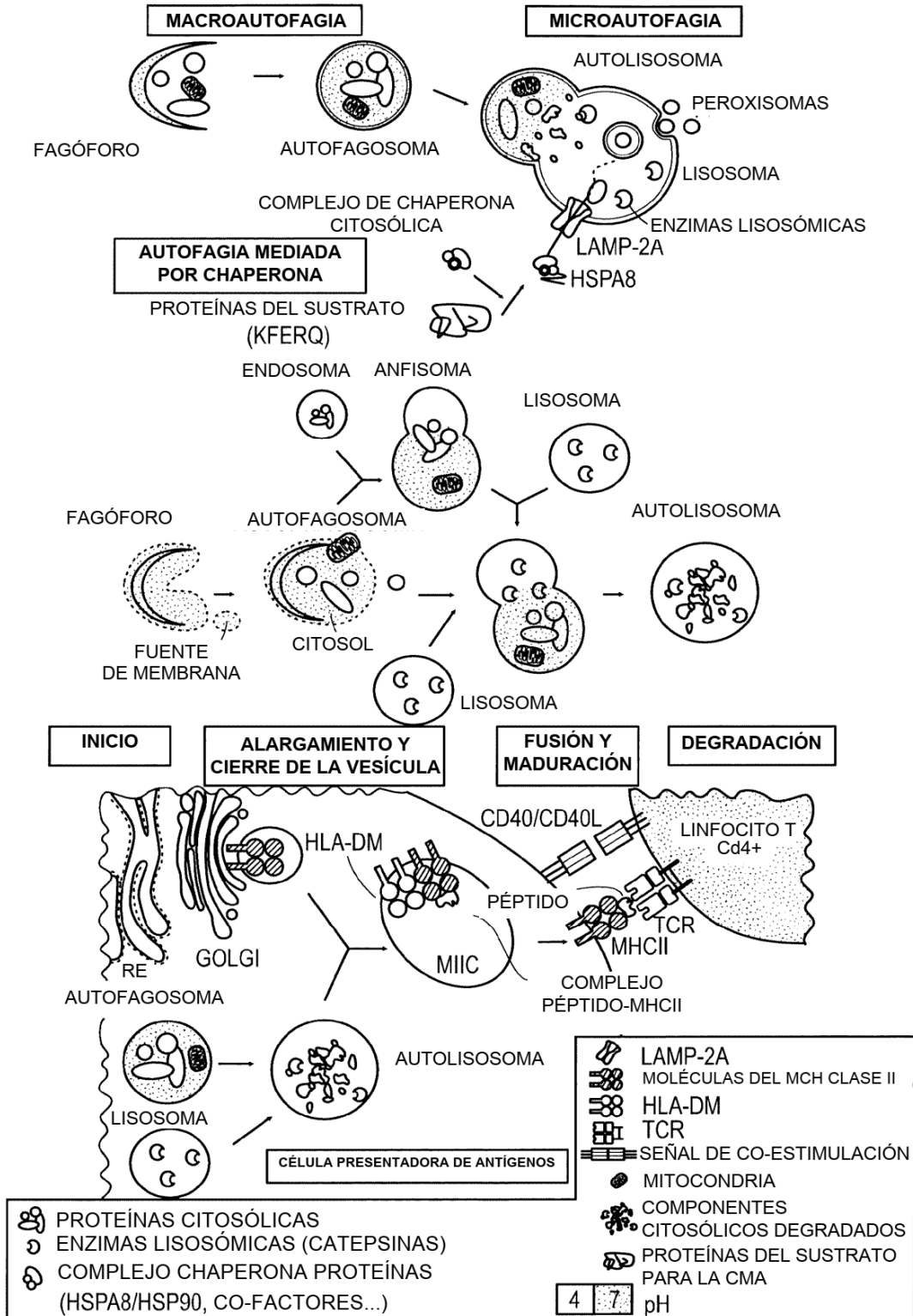
REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende una cantidad eficaz de al menos un péptido seleccionado de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1, 2, 4, 5 y una combinación de las mismas, en la que al menos una serina del péptido está fosforilada, para su uso en el tratamiento o mejora de un síntoma de una enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos, en el que la enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos se selecciona de entre el grupo que consiste en distrofia muscular (MD), fibromialgia, miopatías, polirradiculoneuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), inflamación eosinofílica de las vías aéreas y psoriasis, y la composición se administra a un paciente que necesita dicho tratamiento y la composición es eficaz en el tratamiento o mejora de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno.
2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es MD.
3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es fibromialgia.
4. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es asma.
5. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es psoriasis.
6. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es inflamación eosinofílica de las vías aéreas.
7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es COPD.
8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es CIDP.
9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicha enfermedad o trastorno inflamatorios crónicos es miopatía.
10. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición se administra a una dosificación de desde aproximadamente 100 ng a aproximadamente 5 mg.
11. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que dicha composición comprende un péptido liofilizado de la reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
12. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el excipiente es manitol.
13. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1-12, en la que el péptido es la SEQ ID NO: 1, que incluye una fosfoserina en la posición 10.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1-13, en la que el péptido es la SEQ ID NO: 1, que incluye una fosfoserina en la posición 10 y una metionina oxidada.
15. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que el péptido tiene la estructura:



16. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que el péptido tiene la estructura:

FIG. 1



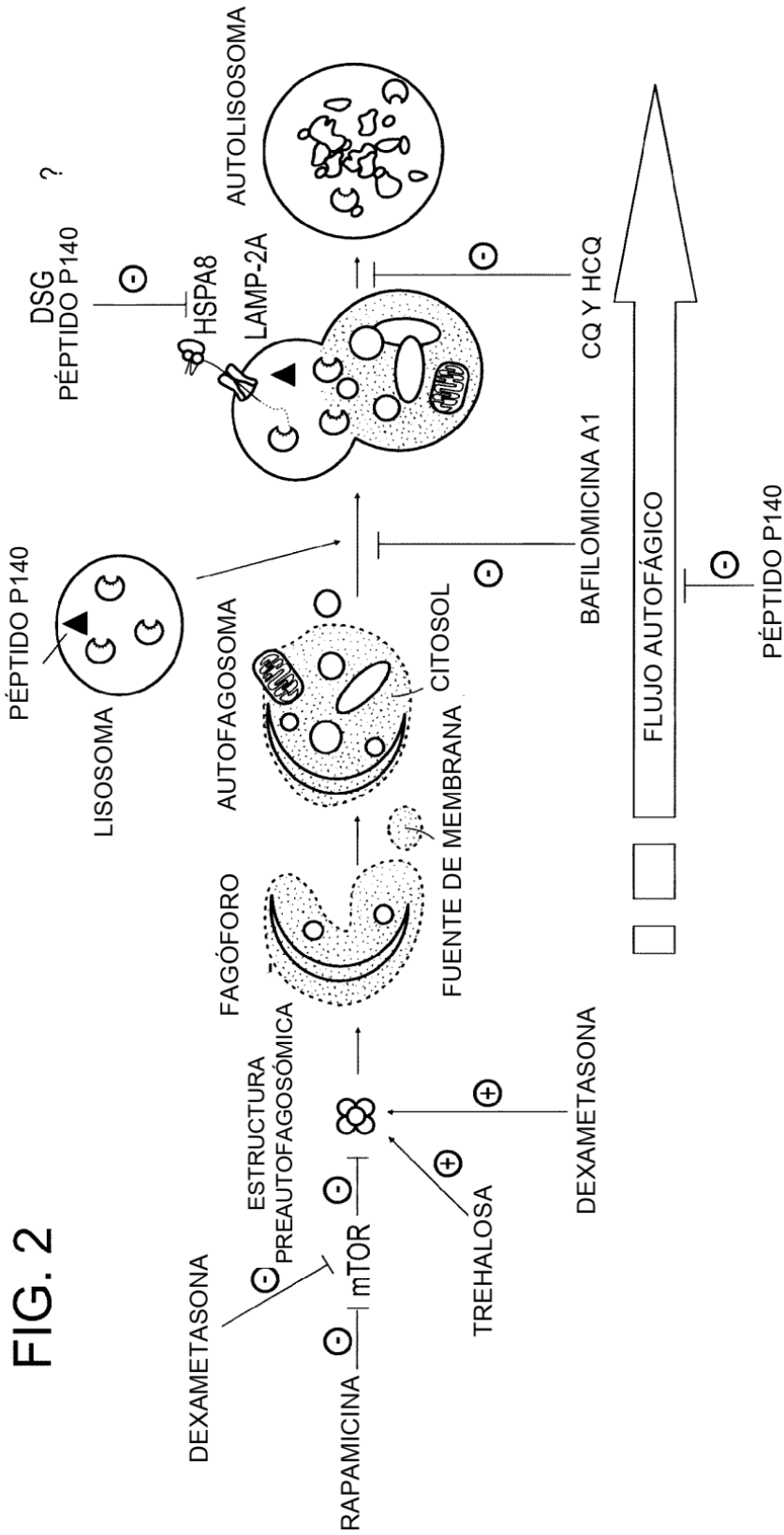


Figura 3

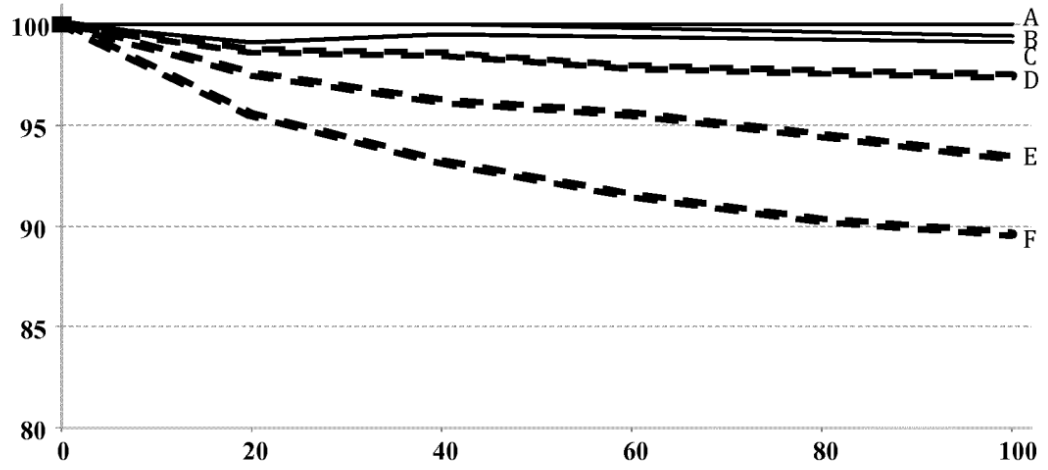


Figura 4

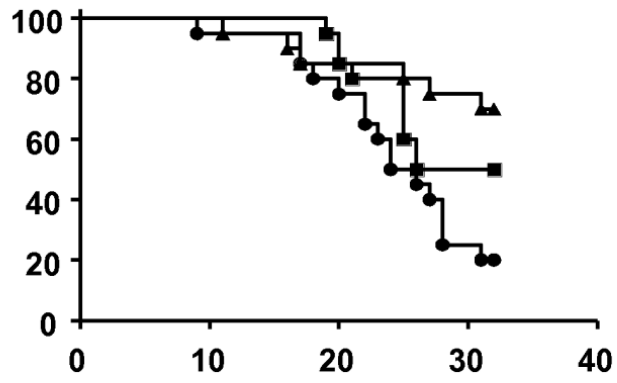


Figura 5

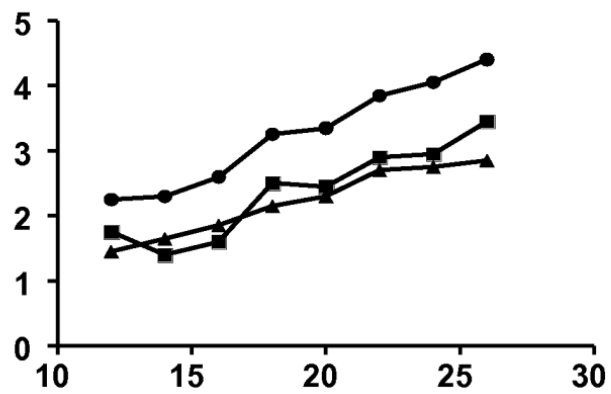


Figura 6

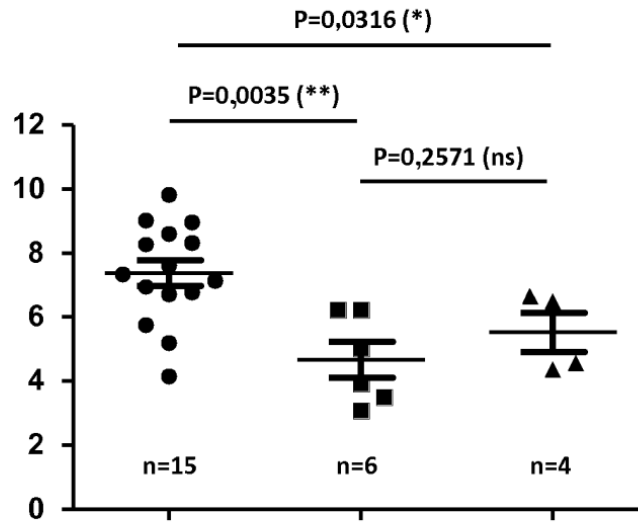


Figura 7

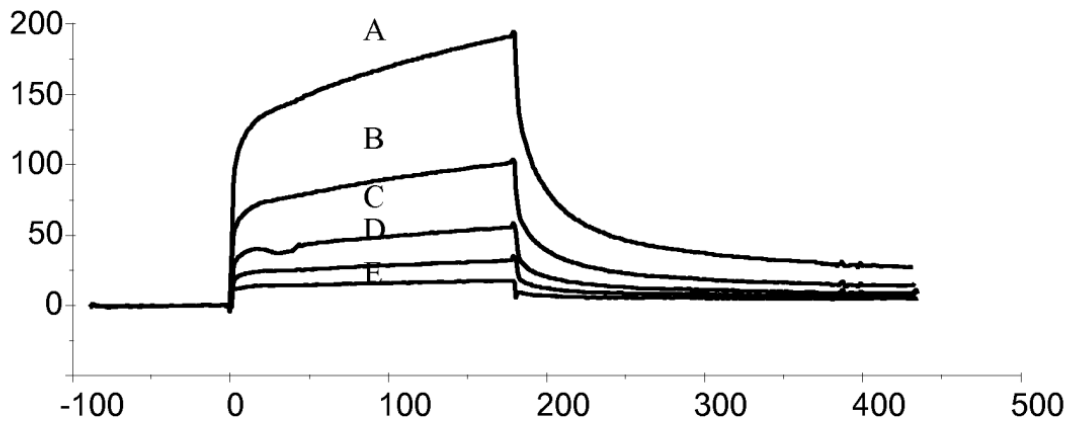


Figura 8

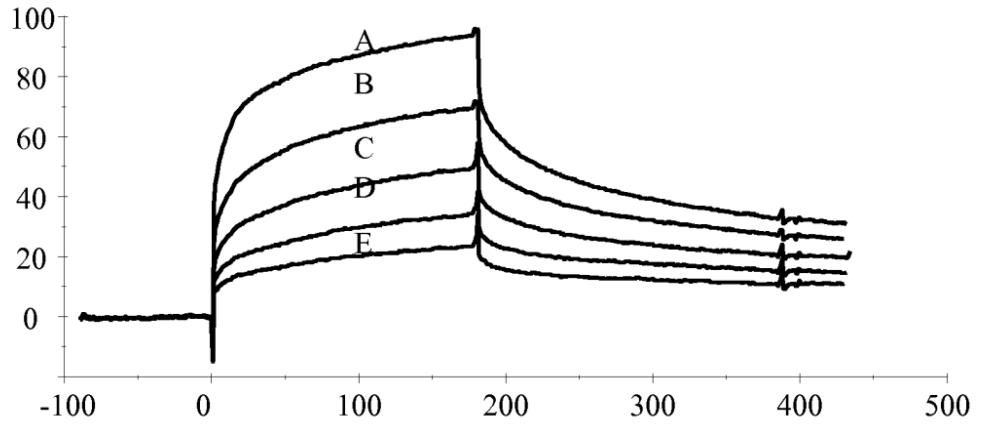


Figura 9

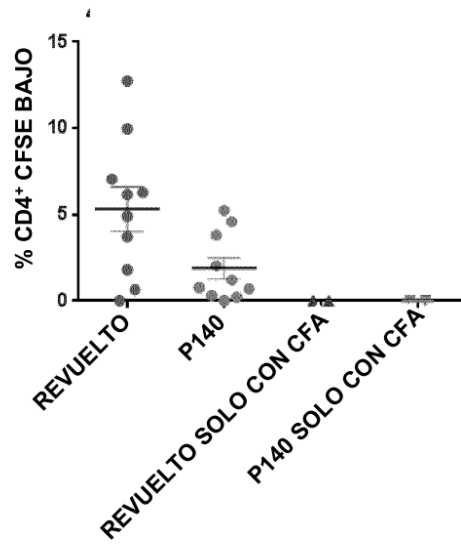


FIG. 10

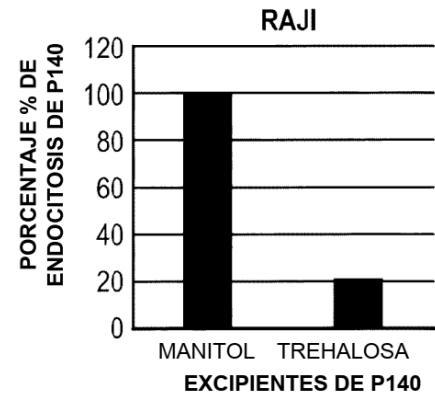
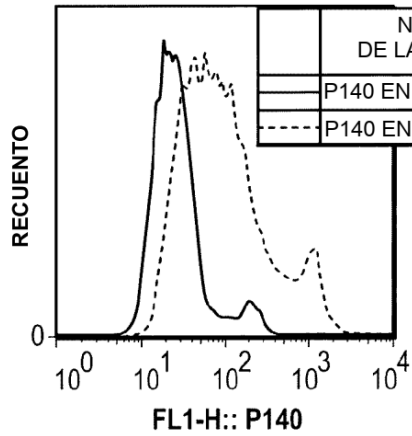
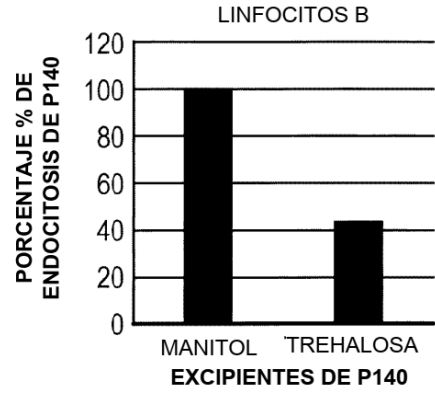
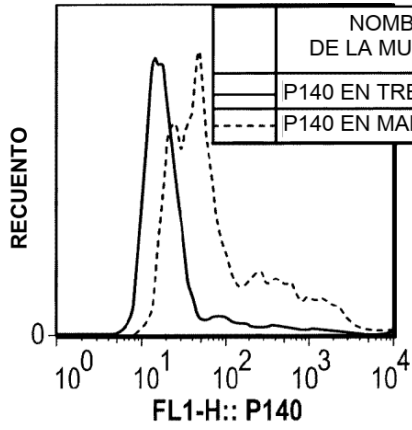


Figura 11

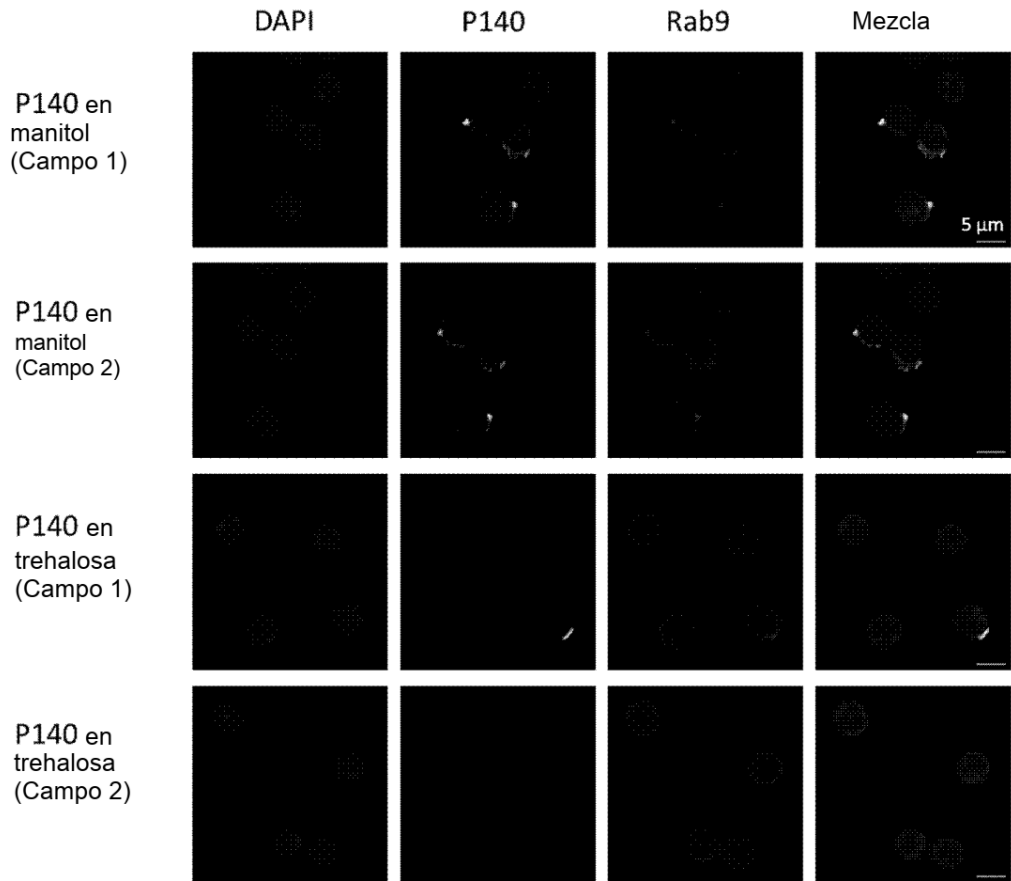


Figura 12

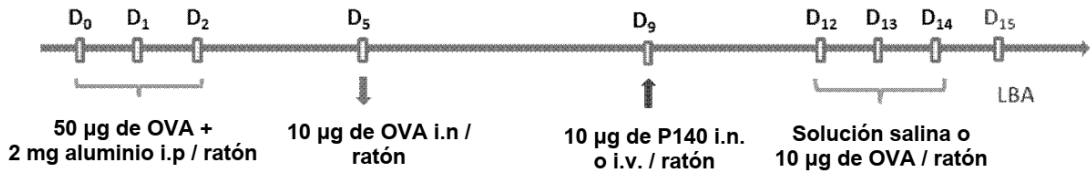


Figura 13

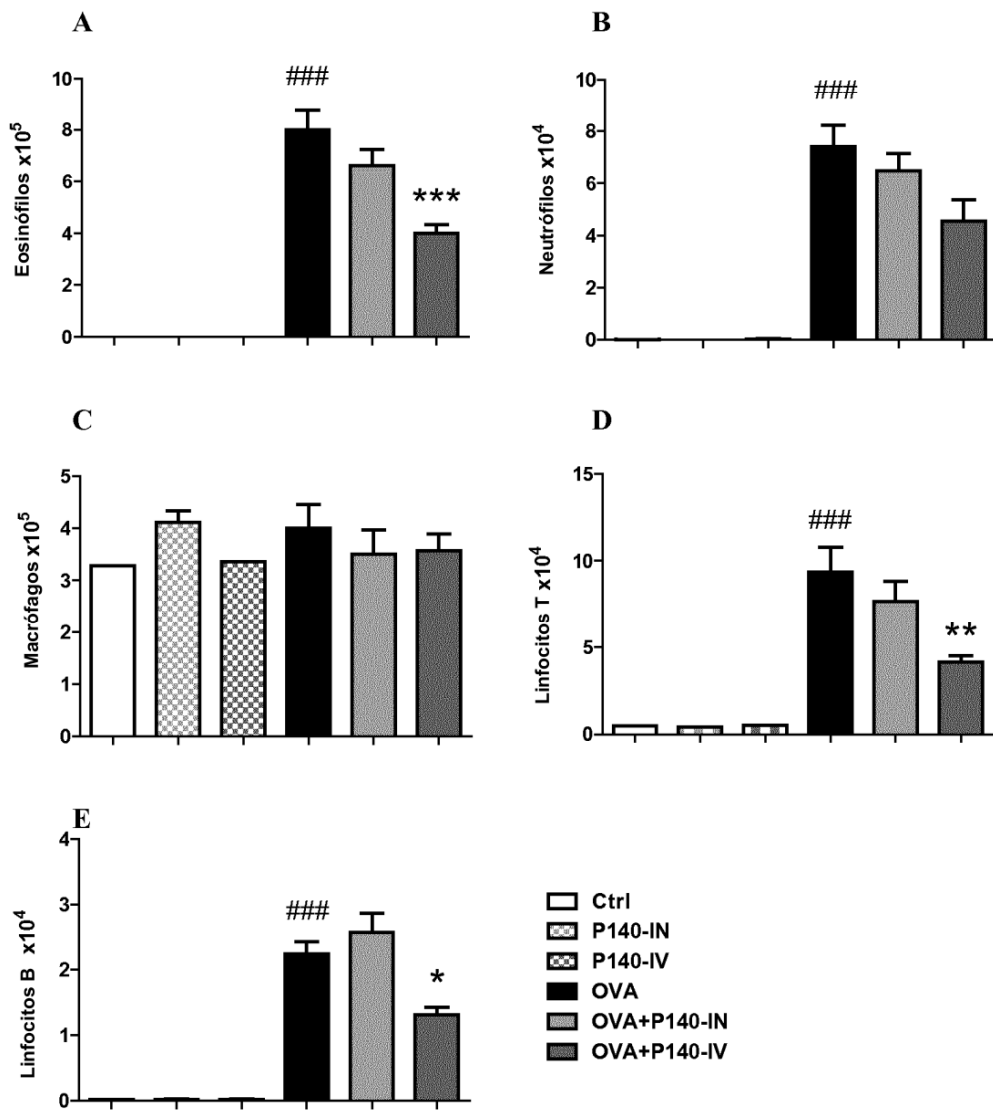


Figura 14

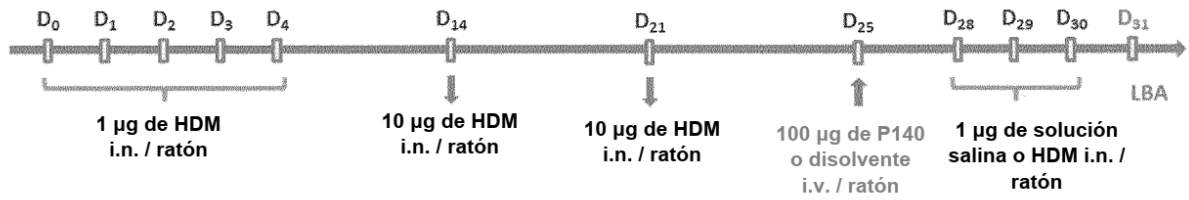


Figura 15

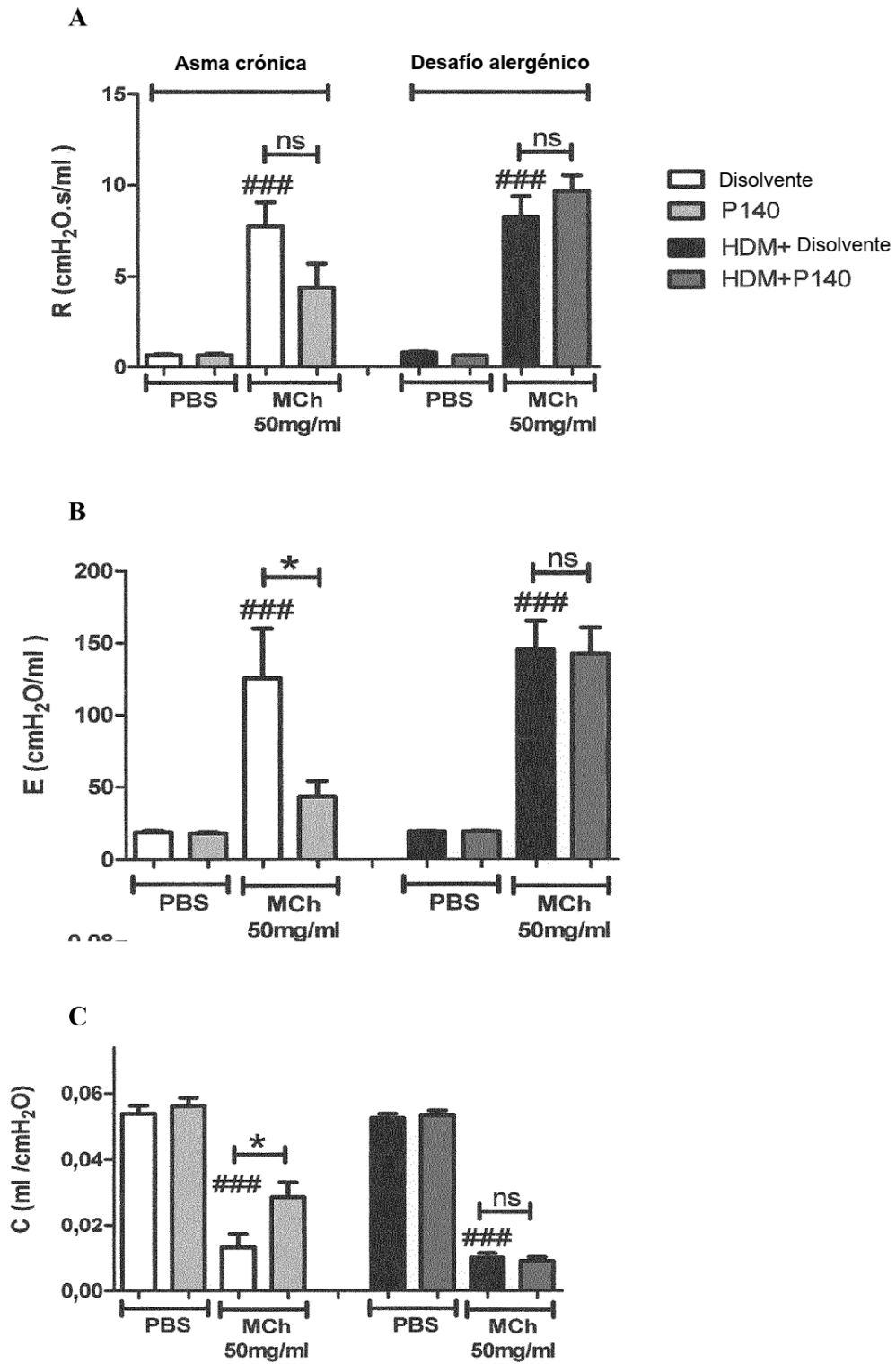


Figura 16

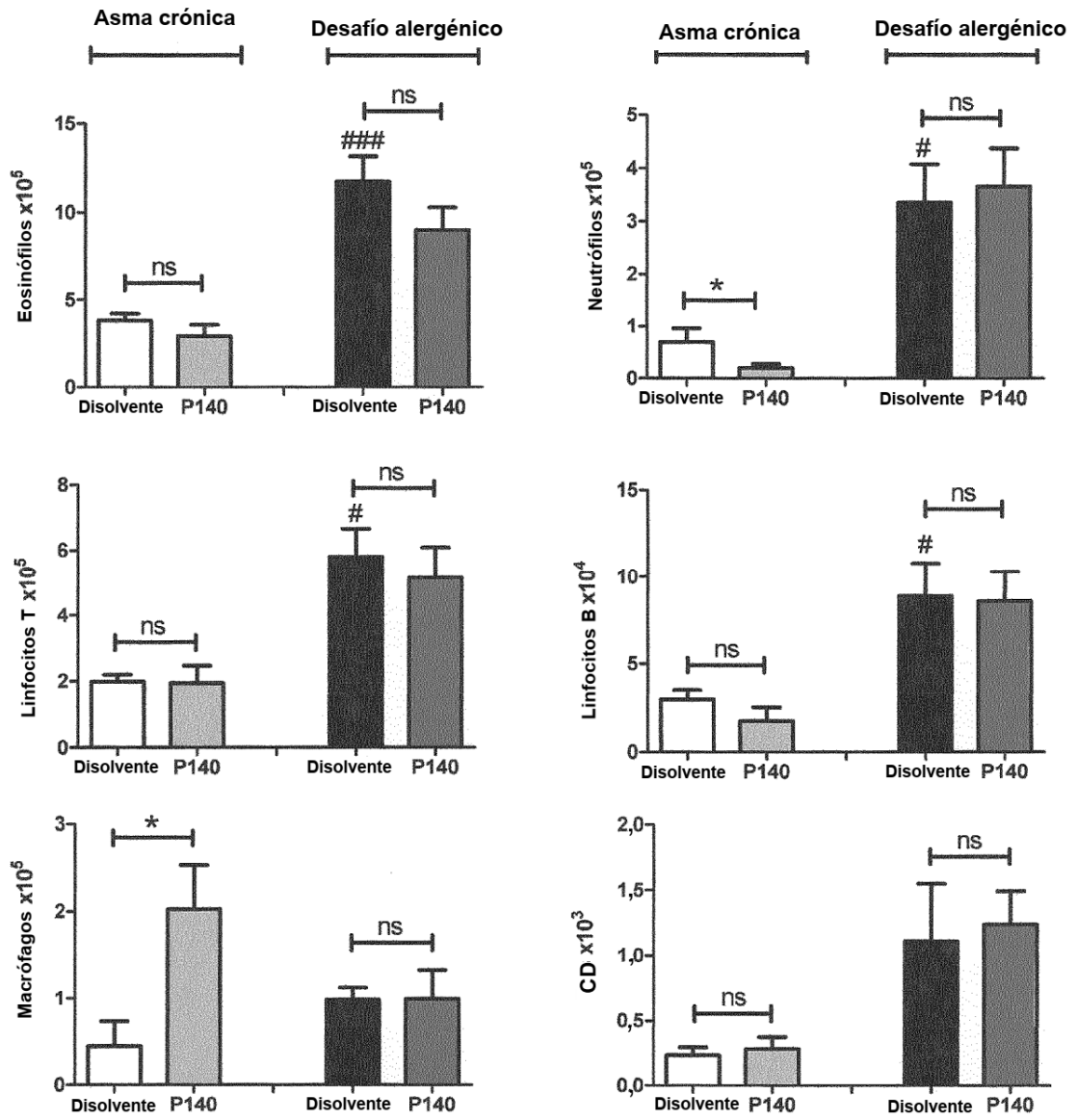


Figura 17

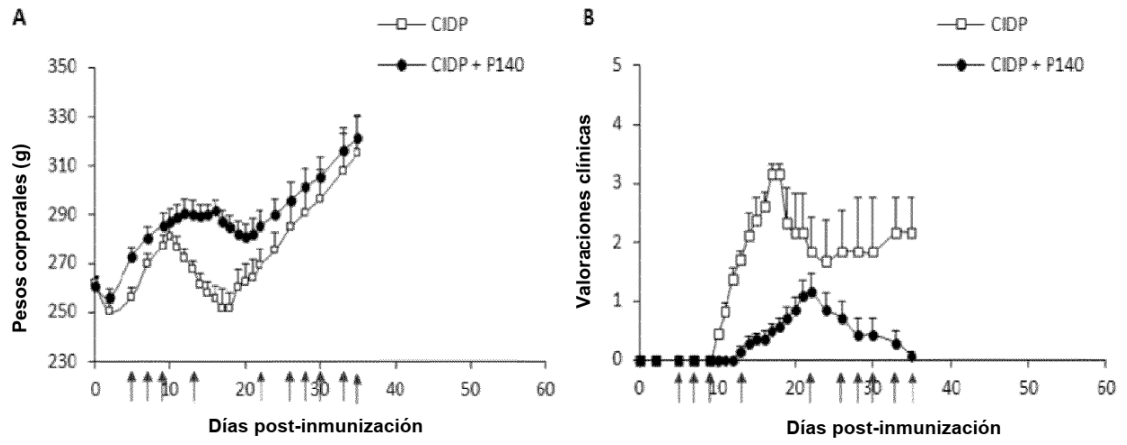


Figura 18

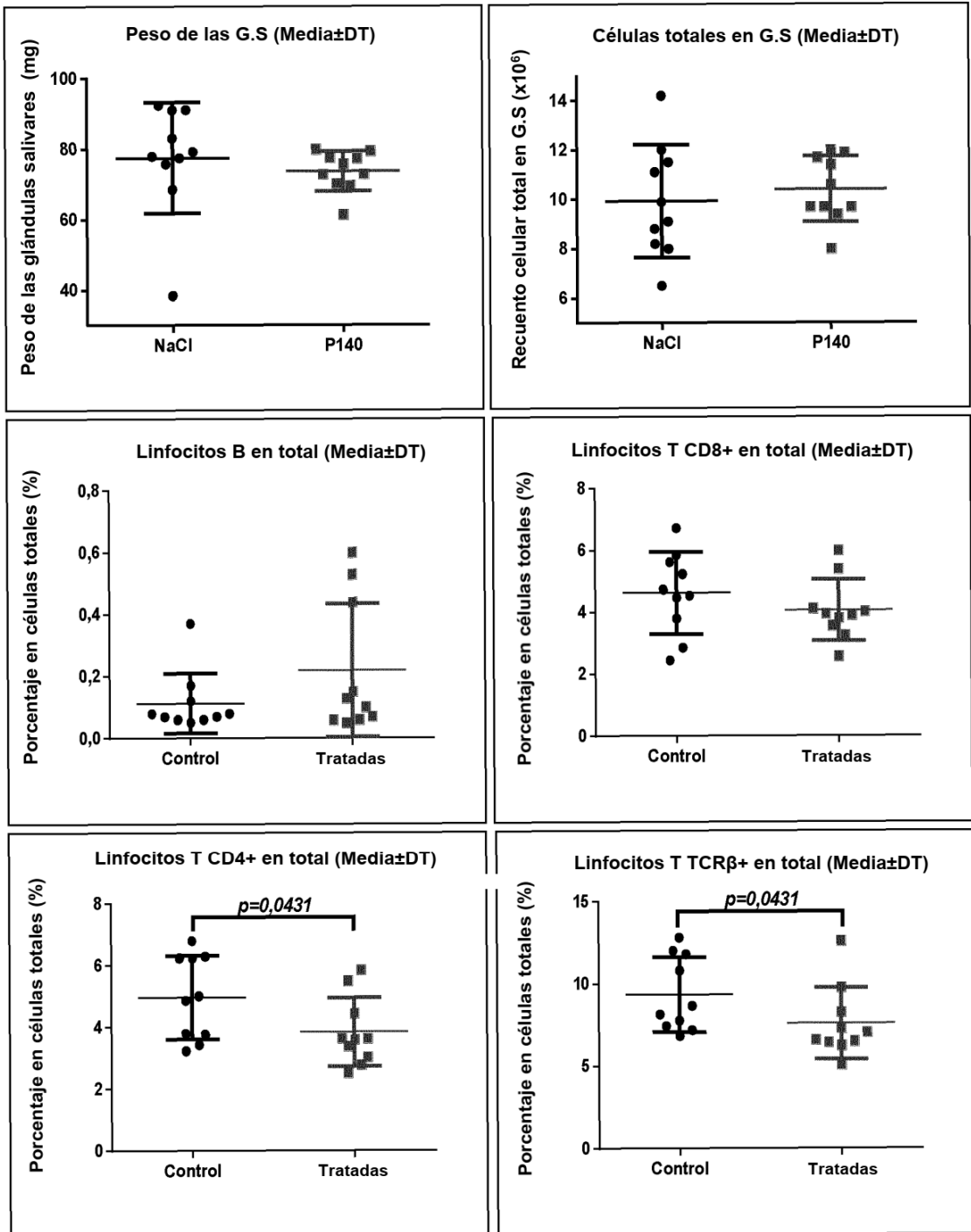


Figura 19

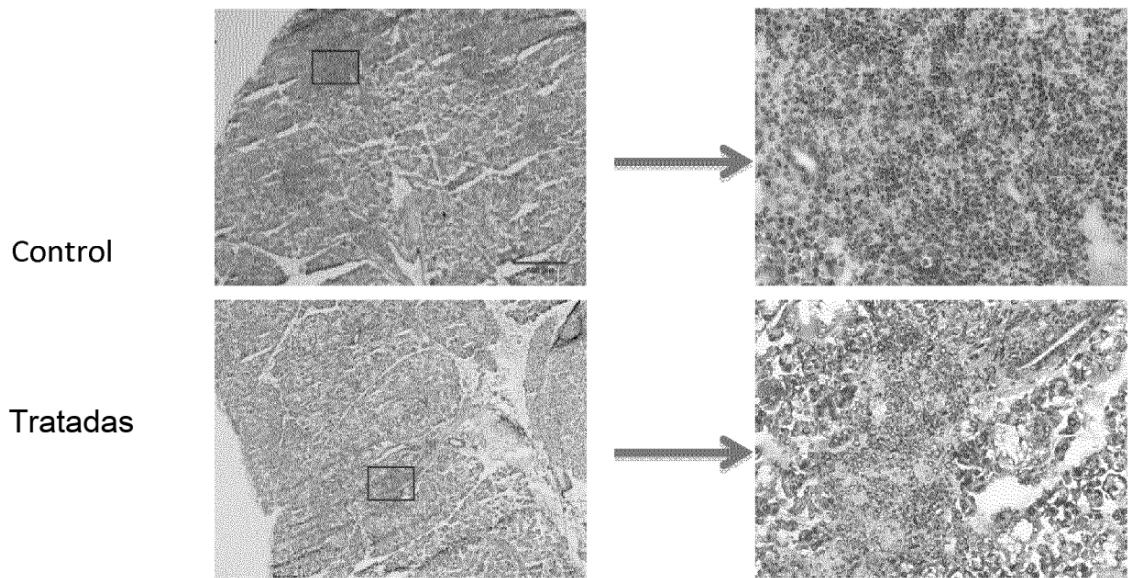


Figura 20

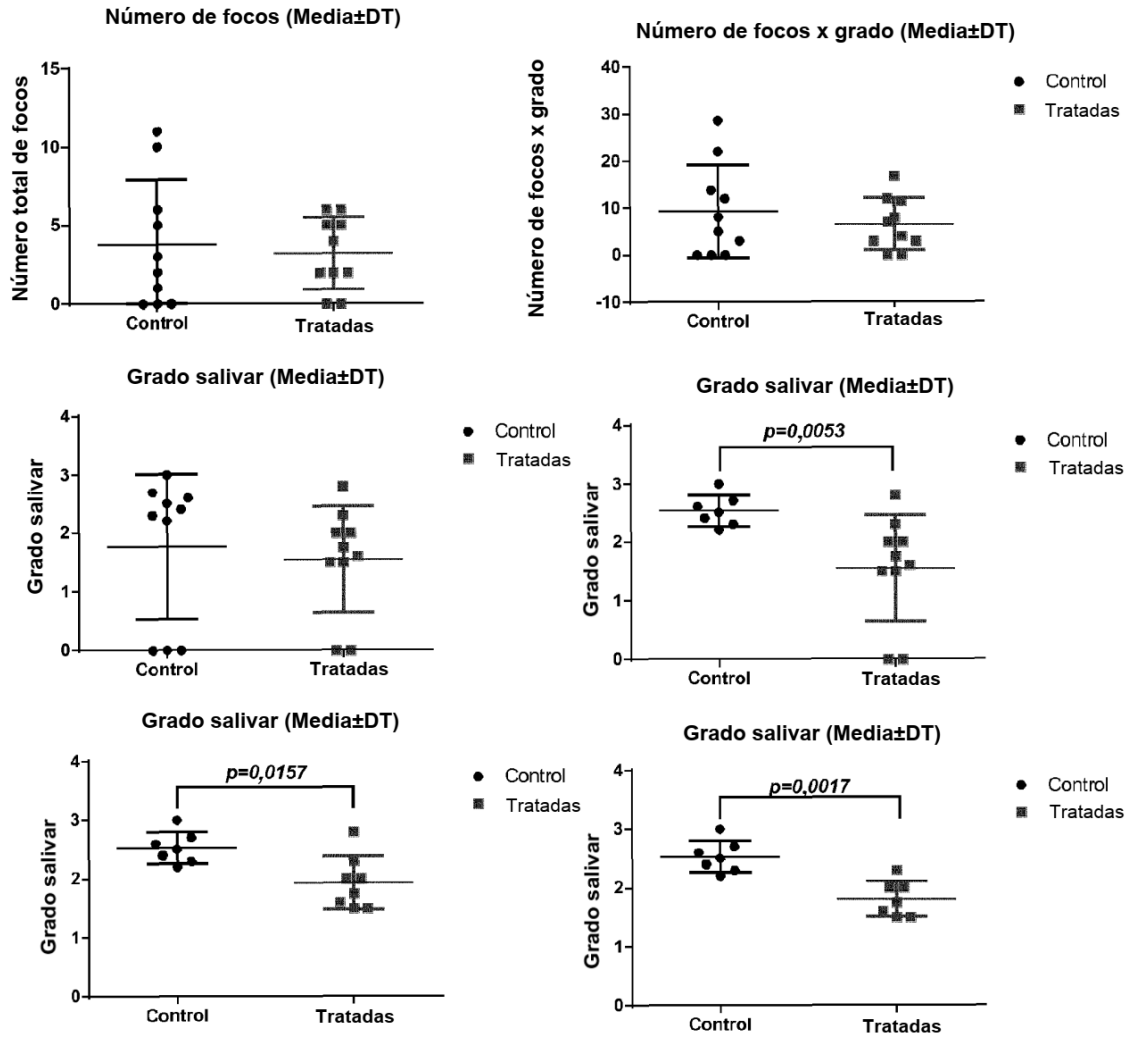


Figura 21

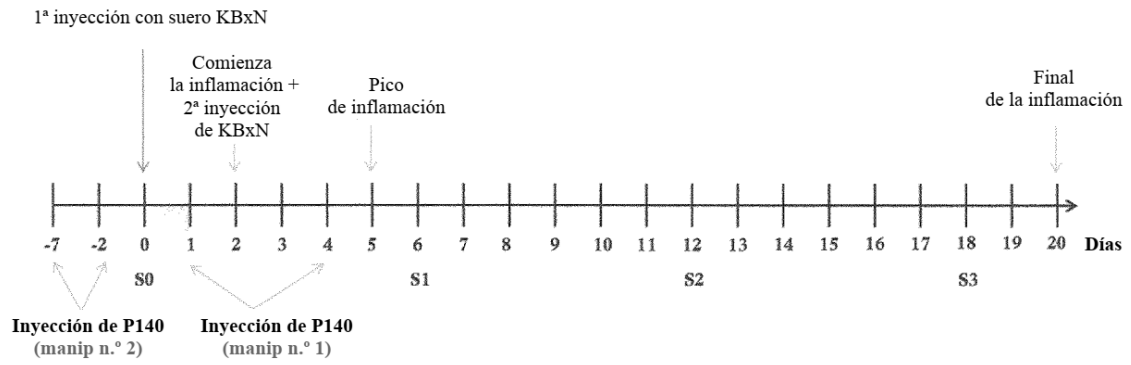


Figura 22

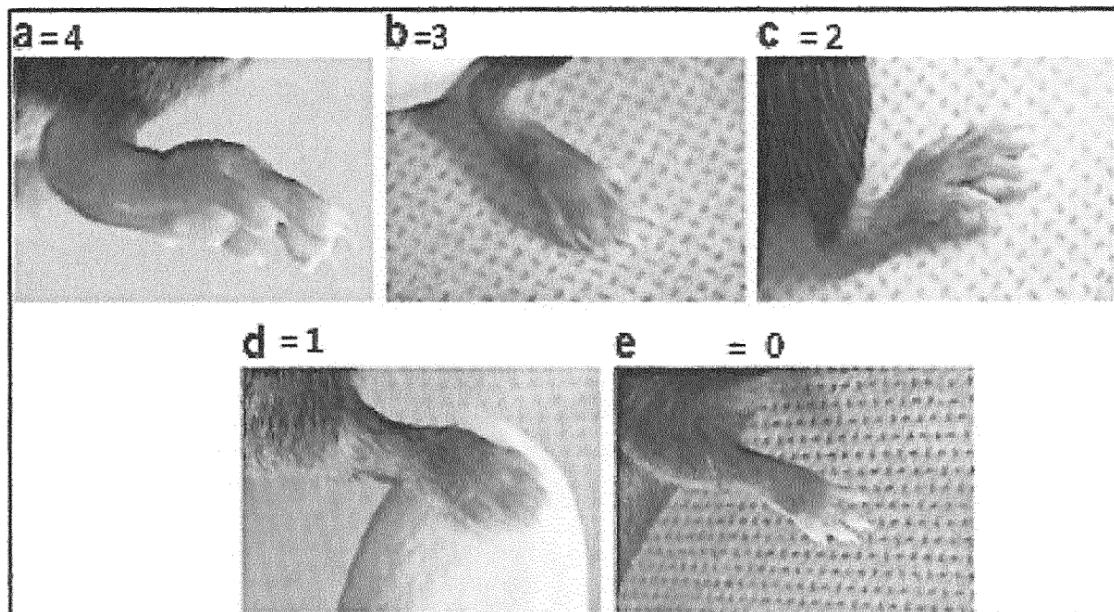


Figura 23

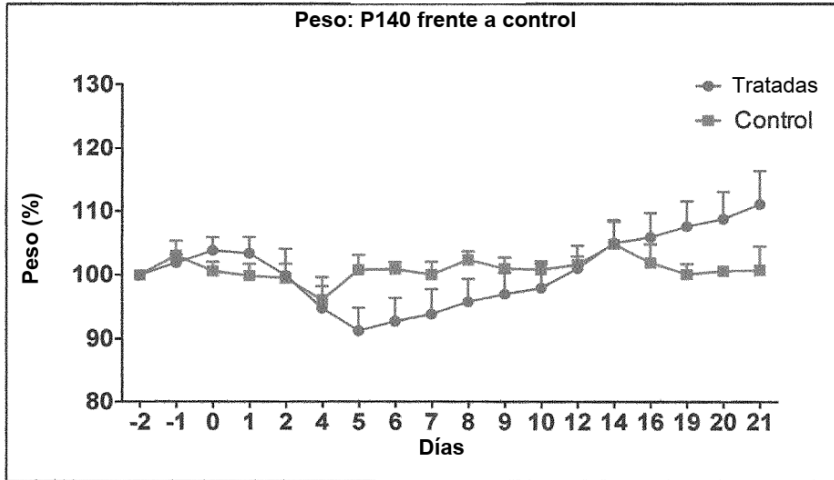


Figura 24

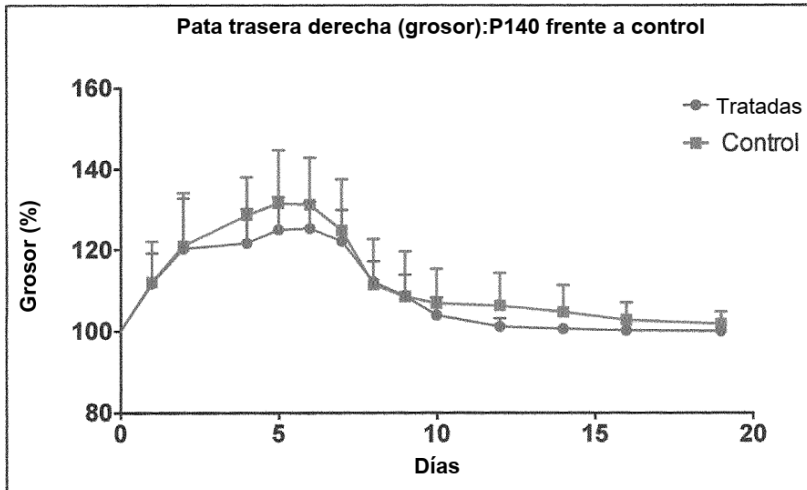


Figura 25

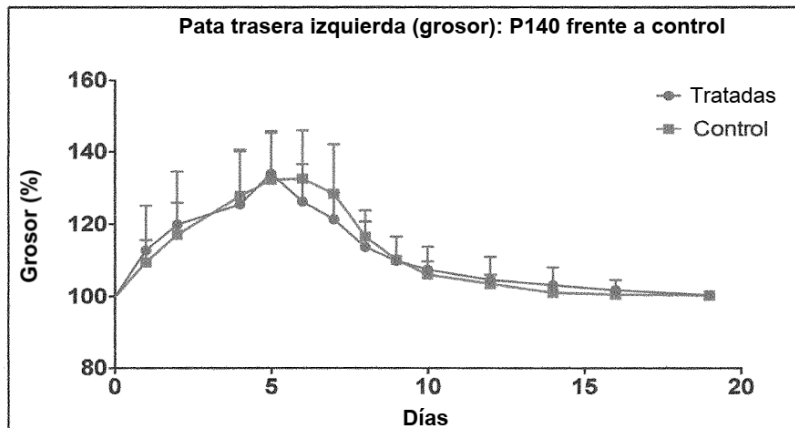


Figura 26

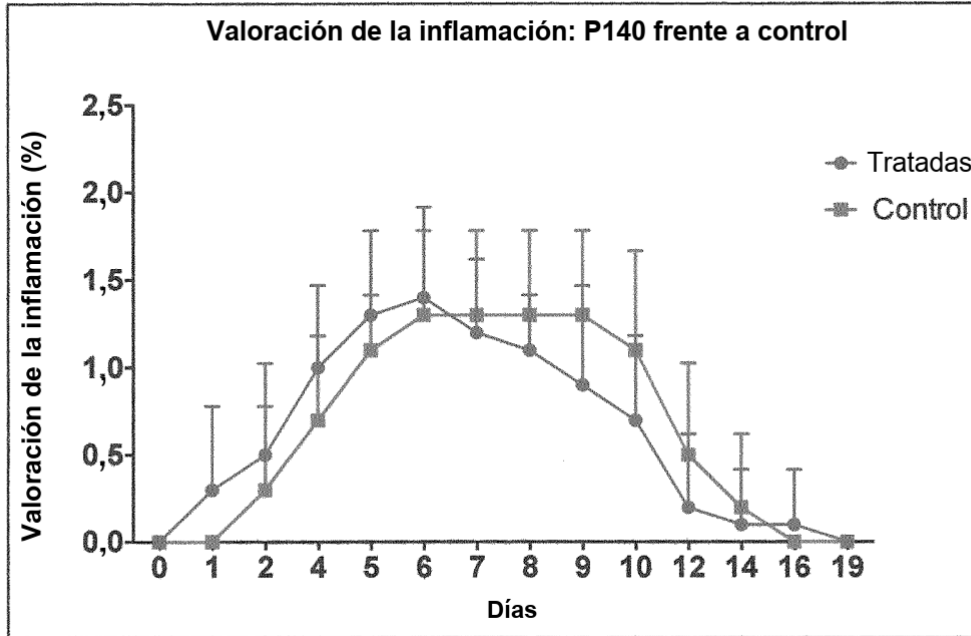


Figura 27

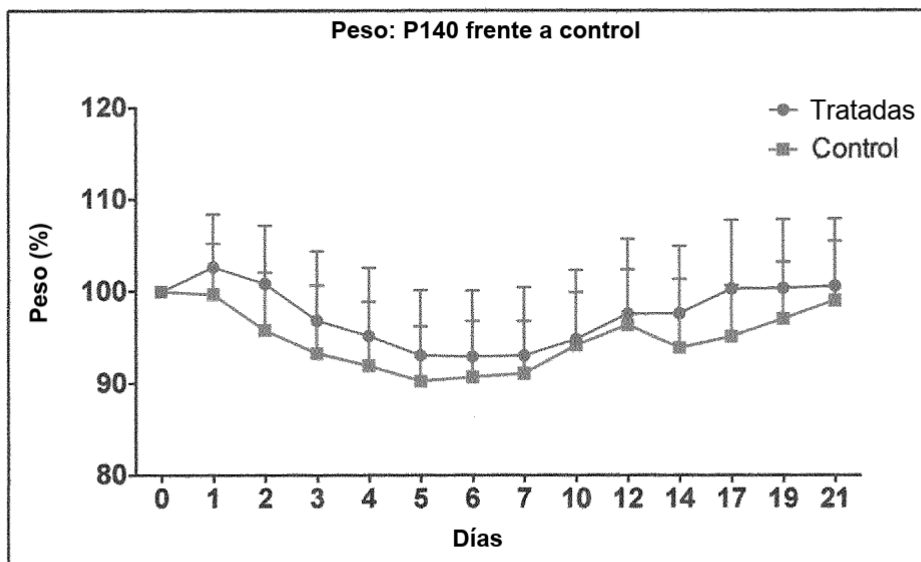


Figura 28

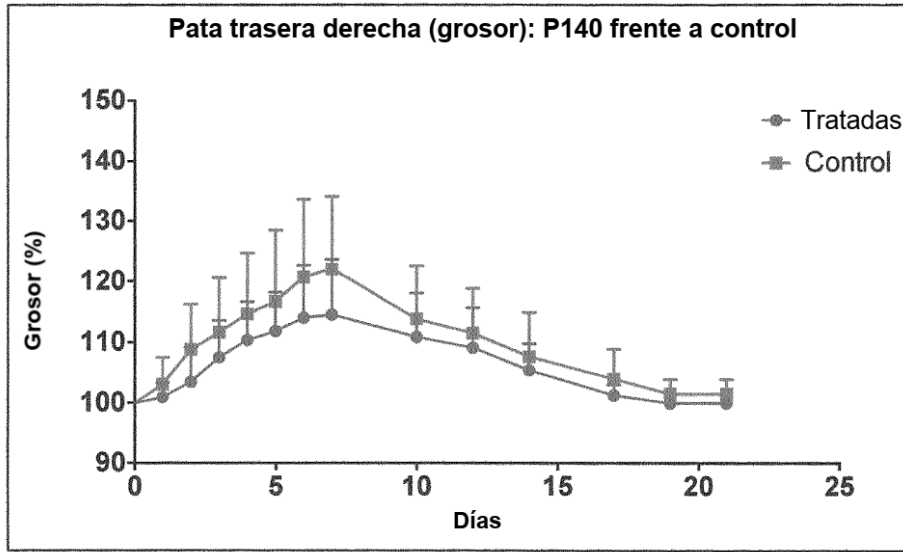


Figura 29

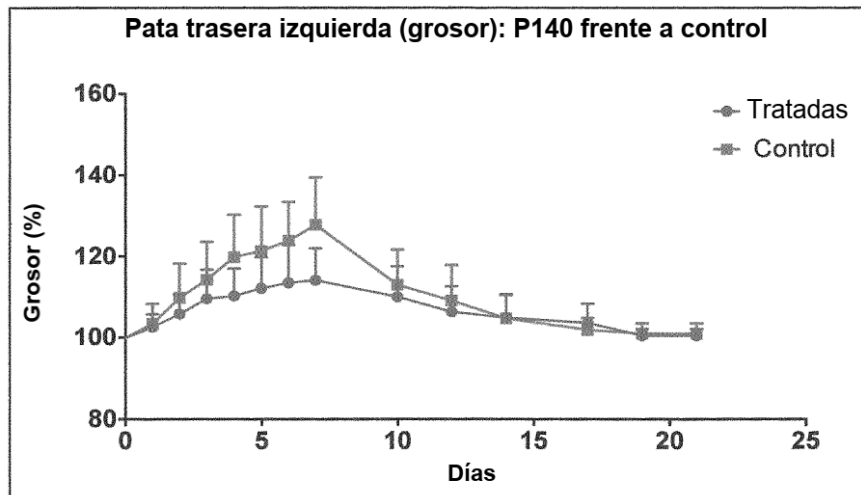


Figura 30

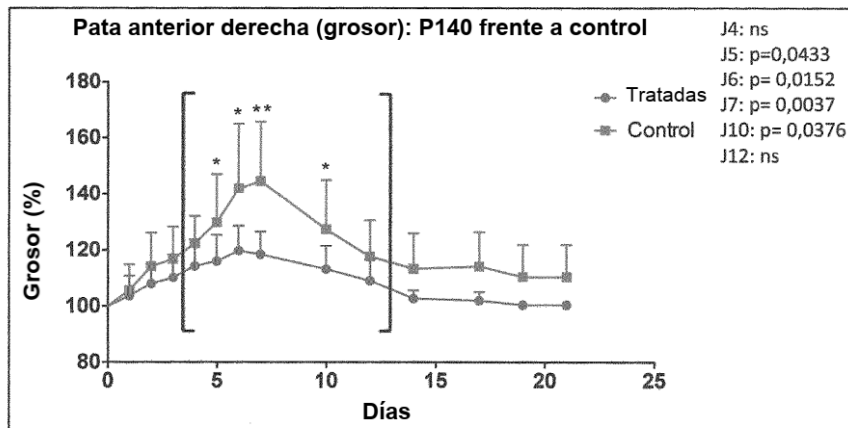


Figura 31

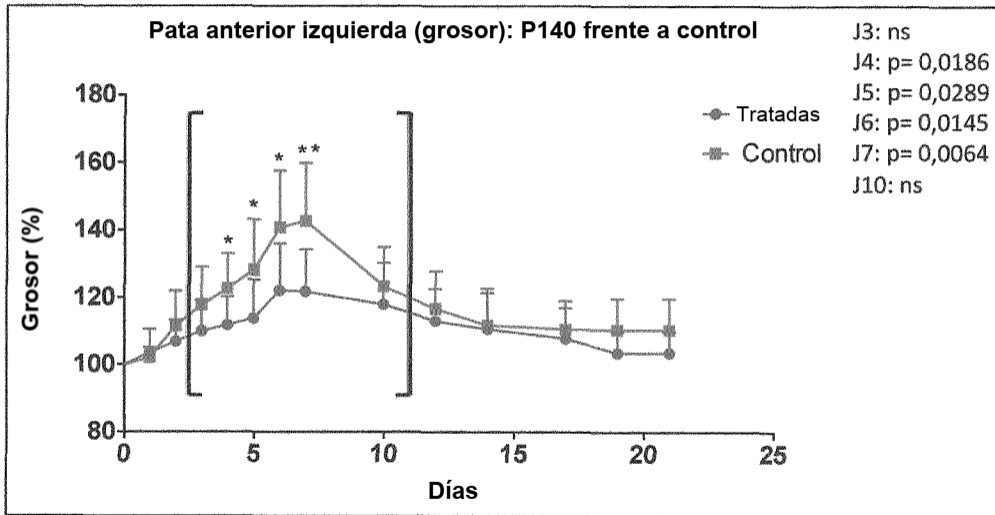
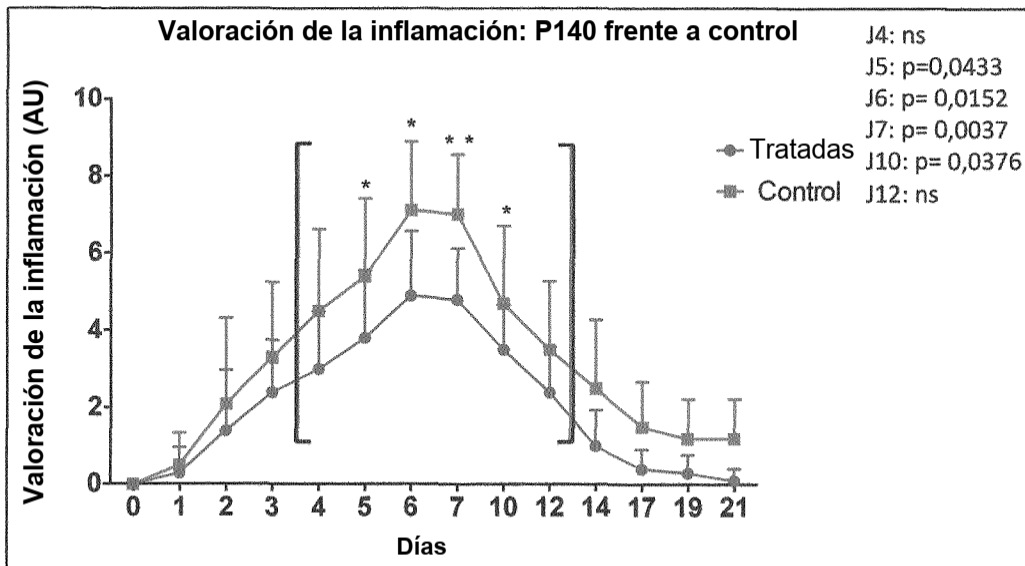


Figura 32



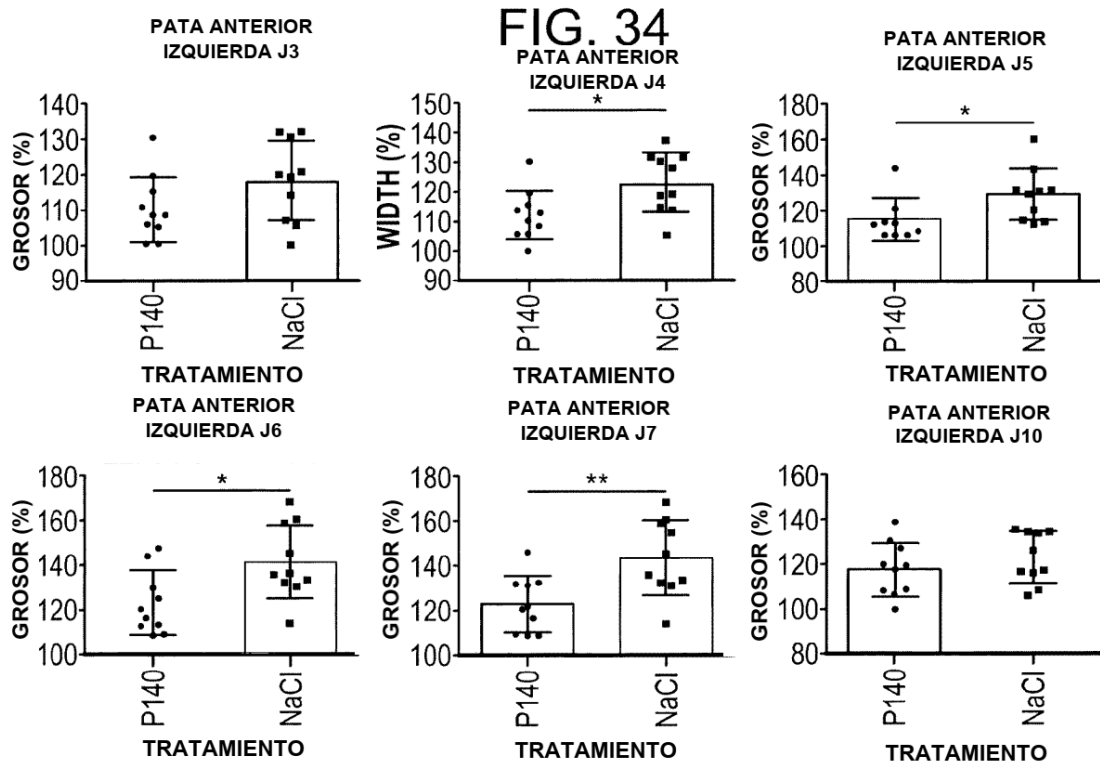
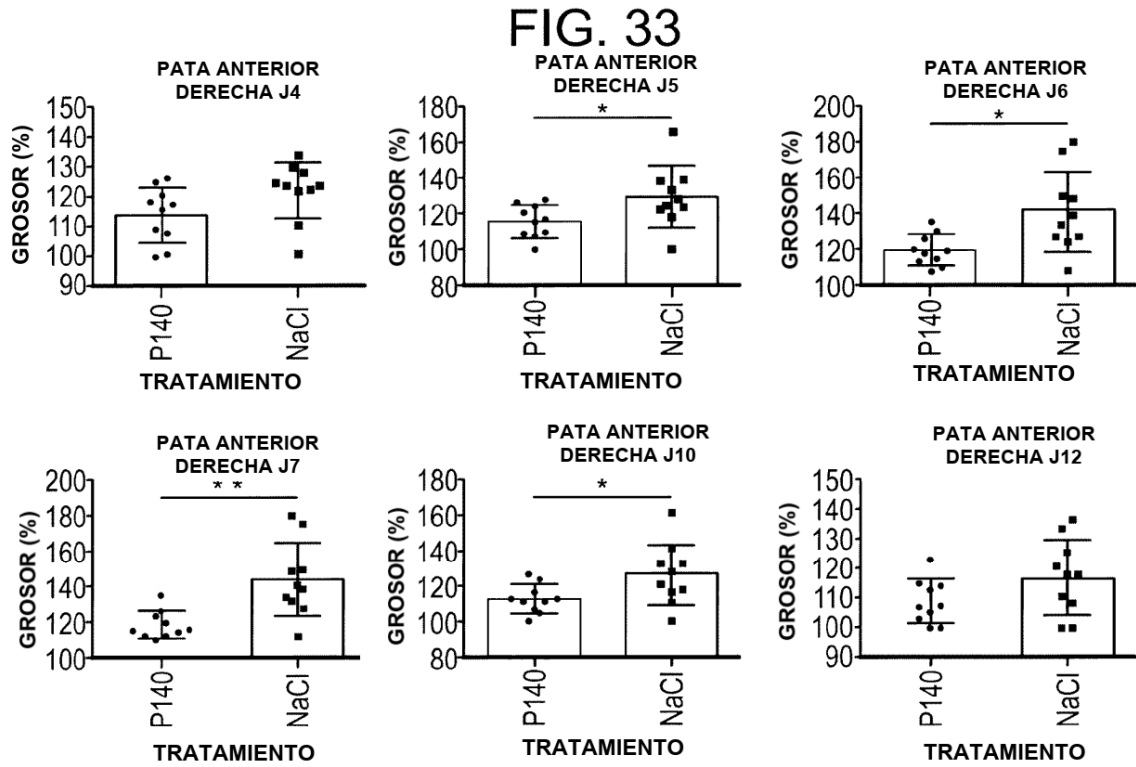


FIG. 35

