

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 770 438**

51 Int. Cl.:

C07K 14/35 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.10.2012** **PCT/GB2012/052586**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.04.2013** **WO13057499**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.10.2012** **E 12775541 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.11.2019** **EP 2768850**

54 Título: **Péptidos novedosos**

30 Prioridad:

21.10.2011 GB 201118201

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

01.07.2020

73 Titular/es:

IMMUNE REGULATION LIMITED (100.0%)
c/o BCS Windsor House, Station Court Station
Road, Great Shelford
Cambridgeshire CB22 5NE, GB

72 Inventor/es:

COATES, ANTHONY ROBERT MILNES;
TORMAY, PETER y
LIGHTFOOT, ANDREW

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 770 438 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 novedosos

- 5 La presente invención se refiere a péptidos novedosos derivables del polipéptido chaperonina 60.1 y a su uso en medicina, tal como para la prevención y/o tratamiento de condiciones inflamatorias.

10 Los polipéptidos de choque de calor son una familia de moléculas halladas en todos los organismos, cuya función es ayudar al procesamiento biológico y estabilidad de moléculas biológicas (Zugel & Kauffman (1999) Role of heat shock polypeptides in protection from and pathogenesis of infectious diseases infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. (12)1: 19-39; Ranford et al. (2000) Chaperonins are cell signalling polypeptides: - the unfolding biology of molecular chaperones. Exp. Rev. Mol. Med., 15 septiembre, www.ermn.cbcu.cam.ac.uk/).

15 Los polipéptidos de choque de calor están localizados en todo compartimiento celular, y poseen la habilidad para interactuar con un amplio espectro de moléculas biológicas. En particular, los polipéptidos de choque de calor ayudan e influyen el plegamiento de polipéptido y translocación de polipéptido en cualquier tiempo, desde el ensamble a través del desensamble del polipéptido y cualesquier complejos de ellos. La naturaleza de ayudador de los polipéptidos de choque de calor ha conducido a que ellos sean conocidos también como chaperonas moleculares (Laskey et al. (1978) Nucleosomes are assembled by an acidic polypeptide, which binds histones and transfers them to DNA. Nature (275): 416-420).

25 Los polipéptidos de choque de calor son sintetizados por las células en respuesta a la tensión ambiental, lo cual incluye, pero no está limitado a cambios en la temperatura (tanto incrementos como descensos), y señales patofisiológicas tales como citoquinas. En respuesta a la tensión ambiental, los polipéptidos de choque de calor usan su habilidad para procesar otros polipéptidos para proteger tales polipéptidos de cualquier desnaturalización que pueda ocurrir debida a la presencia de la tensión. Este mecanismo sirve también para proteger células que contienen la proteína.

30 Los polipéptidos de chaperoninas son un subgrupo de polipéptidos de choque de calor cuyo papel en el plegamiento de polipéptidos es bien conocido. Existen dos familias de polipéptidos de chaperonina, las familias de chaperonina 60 (aproximadamente 60 kDa) y chaperonina 10 (aproximadamente 10 kDa) (Ranford, 2000). Las chaperoninas mejor caracterizadas son aquellas derivadas de *E. coli*, de las cuales se ha establecido la estructura característica de chaperonina 60 y chaperonina 10. Los complejos de chaperonina de la mayoría de otros organismos también están conformes sustancialmente con esta estructura característica.

35 La estructura característica de chaperoninas es un complejo formado por dos anillos de heptámero (compuestos de siete monómeros de chaperonina 60) que están uno frente a otro y están tapados por un anillo de heptámero compuesto por monómeros de chaperonina 10.

40 Convencionalmente, las chaperoninas ayudan al plegamiento del polipéptido cuando el polipéptido objetivo entra al núcleo central de los heptámeros de anillo, y en la subsiguiente liberación de energía del ATP, el polipéptido objetivo es liberado desde el núcleo central por un cambio en la conformación de la estructura de la chaperonina (Ranson et al. (1998) Review Article: Chaperones. Biochem. J (333): 233-242).

45 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) produce chaperonina 60.1 (Cpn60.1), un polipéptido que es nombrado sobre la base de su identidad de secuencia de aminoácidos, respecto a otras chaperoninas conocidas. Además, los polipéptidos de chaperonina de *M. tuberculosis* son chaperonina 10 (Cpn10) y chaperonina 60.2 (Cpn60.2). Cpn60.2 exhibe 59.6% de identidad de secuencia de aminoácidos y 65.6% de identidad de secuencia de ácido nucleico frente a Cpn60.1.

50 La Solicitud de Patente Internacional, Número de Publicación WO02/040037 divulga composiciones farmacéuticas que comprenden Cpn60.1 de *M. tuberculosis* (MtCpn60.1) y sus moléculas que codifican ácido nucleico. Este documento también divulga varios fragmentos de péptido específico derivables de la totalidad de la longitud de polipéptido que poseen actividad biológica similar. También se divulga una variedad de usos terapéuticos de estas moléculas, incluyendo el tratamiento y/o prevención de desórdenes autoinmunes, condiciones alérgicas, condiciones tipificadas por una respuesta inmune de tipo Th2 y condiciones asociadas con eosinofilia.

60 La Solicitud de Patente Internacional, Número de Publicación WO2009/106819 divulga una serie de péptidos novedosos derivables de MtCpn60.1 que incluye un péptido (designado como "Péptido 4") que tiene una secuencia de aminoácidos: DGSVVVNKVELPAGHGLNVNTLSYGDLAAD. El Péptido 4 exhibe actividad antiinflamatoria y se ha mostrado que reduce de manera significativa el reclutamiento de eosinófilos en un modelo animal de inflamación alérgica de las vías respiratorias.

65 La presente invención se basa en el hallazgo inesperado según el cual ciertos subfragmentos novedosos de Péptido 4 (DGSVVVNKVELPAGHGLNVNTLSYGDLAAD) exhiben actividad biológica, en particular una habilidad para inhibir la diapedesis de leucocitos. Los péptidos novedosos de la presente invención son particularmente adecuados

para desarrollo como farmacéuticos, debido a su longitud de cadena de aminoácidos comparativamente corta, lo cual los hace convenientes para la preparación y aislamiento en elevado rendimiento. También se indicó que poseen estabilidad biológica *in vivo* mejorada respecto a MtCpn60.1 y fragmentos conocidos de péptido de la misma.

- 5 Así, en un primer aspecto, la presente invención suministra una molécula de péptido aislado o recombinante, que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo:

(i) DGSVVVNKVSSELPAGH;

10 (ii) GLNVNTLSYGDLAAD; y

(iii) SELPAGHGLNVNTLS.

15 Se entiende por “funcionalmente equivalente” cualquier péptido descrito y/o variante o fragmento del mismo, que posee una función (por ejemplo actividad biológica) que es idéntica o sustancialmente similar a cualquier función desplegada por o atribuida a una o más de las secuencias (i) a (iii) definidas de aminoácidos. Por ejemplo, péptidos que consisten en las secuencias de aminoácidos definidas en (i) a (iii) exhiben propiedades antiinflamatorias que permiten su uso en la prevención y/o tratamiento de una variedad de enfermedades y desórdenes, incluyendo artritis y dolor. La equivalencia funcional respecto a una actividad biológica particular puede ser medida usando modelos y métodos convencionales; por ejemplo, midiendo la latencia de pata sobre una placa calentada o midiendo la liberación de citoquinas antiinflamatorias *in vivo* o *in vitro*.

25 Se entiende por “variante” un péptido descrito que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene 70% o más, tal como 75%, 80%, 85%, 90% o 95% de identidad respecto a una secuencia definida en cualquiera de los listados (i) a (vi) de secuencia anteriores. Así, el término “variante” se refiere a polipéptidos y péptidos que difieren de moléculas de ocurrencia natural por inserciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos, creadas usando, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante. La guía en la determinación de cuáles residuos de aminoácidos pueden ser reemplazados, añadidos o borrados sin eliminar actividades de interés, puede ser hallada mediante comparación de la secuencia del polipéptido particular con la de péptidos homólogos y minimizando el número de cambios de secuencia de aminoácidos, hechos en regiones de elevada homología (regiones conservadas) o reemplazando aminoácidos con secuencia de consenso.

35 De modo alternativo, las variantes recombinantes descritas que codifican estos mismos polipéptidos o similares, pueden ser sintetizadas o seleccionadas haciendo uso de la “redundancia” en el código genético. Pueden introducirse diferentes sustituciones de codón, tales como los cambios silenciosos que producen diferentes sitios de restricción, para optimizar la clonación hasta un plásmido o un vector viral o expresión en un sistema procariota o eucariota particular. Las mutaciones en la secuencia de polinucleótido pueden reflejarse en el polipéptido o dominios de otros péptidos añadidos al polipéptido para modificar las propiedades de cualquier parte del polipéptido, para cambiar características tales como afinidades de unión de ligando, afinidades entre cadenas, o tasa de degradación/rotación.

45 Las “sustituciones” de aminoácidos descritas son el resultado del reemplazo de un aminoácido con otro aminoácido que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, es decir reemplazos conservadores de aminoácidos. Las sustituciones “conservadoras” de aminoácidos pueden ser hechas sobre la base de similitud en polaridad, carga, solubilidad, carácter hidrófobo, carácter hidrofílico y/o la naturaleza anfipática de los residuos involucrados. Por ejemplo, los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen alanina, leucina, isoleucina, valina, prolina, fenilalanina, triptofano, y metionina; los aminoácidos polares neutros incluyen glicina, serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina, y glutamina; los aminoácidos con carga positiva (básicos) incluyen arginina, lisina e histidina; y los aminoácidos con carga negativa (ácidos) incluyen ácido aspártico y ácido glutámico. Las “inserciones” o “eliminaciones” descritas están preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 1 a 10 aminoácidos, más preferiblemente 1 a 5 aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 4 o 5 aminoácidos. La variación descrita puede ser determinada experimentalmente haciendo de manera sistemática inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos en una molécula de polipéptido, usando técnicas de ADN recombinante y determinando la actividad biológica de las variantes recombinantes resultantes.

55 También se describe que cuando se desea alteración de la función, pueden diseñarse inserciones, eliminaciones o alteraciones no conservadoras, para producir polipéptidos alterados. Por ejemplo, tales alteraciones pueden alterar una o más de las funciones biológicas o características bioquímicas de los polipéptidos de la invención. Por ejemplo, tales alteraciones pueden cambiar características del polipéptido tales como afinidades de unión de ligando, afinidades entre cadenas, o tasa de degradación/rotación. Además, tales alteraciones pueden ser seleccionadas de modo que generen polipéptidos que están mejor adecuados para la expresión, escalamiento y similares en las células anfitrión elegidas para la expresión.

65 La presente invención suministra además una molécula de ácido nucleico aislado o recombinante que consiste en una secuencia de polinucleótido que codifica un péptido que consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo:

1. DGSVVVNKVSSELPAGH;

2. GLNVNTLSYGDLAAD; y

3. SELPAGHGLNVNTLS.

El término "polinucleótido" se refiere a un heteropolímero de nucleótidos o la secuencia de estos nucleótidos. También se refiere a ADN o ARN de origen genómico o sintético, que puede ser de cuerda simple o cuerda doble y puede representar la cuerda en sentido o la cuerda antisentido, para ácido nucleico de péptido (ANP) o para cualquier material similar a ADN o a ARN. En las secuencias de esta memoria A es adenina, C es citosina, T es timina, G es guanina y N es A, C, G o T (U). Se contempla que donde el polinucleótido es ARN, la T (timina) en las secuencias suministradas en esta memoria, es sustituida con U (uracilo). Generalmente, los segmentos de ácido nucleico suministrados por esta invención pueden ser ensamblados a partir de fragmentos del genoma y agentes de enlace de oligonucleótido cortos, o de una serie de oligonucleótidos, o de nucleótidos individuales, para suministrar un ácido nucleico sintético que es capaz de ser expresado en una unidad transcripcional recombinante que comprende elementos reguladores derivados de un operón microbiano o viral, o un gen eucariota.

Los polinucleótidos de la invención incluyen ADN de ocurrencia natural o total o parcialmente sintéticos, por ejemplo, cADN y ADN genómico, y ARN, por ejemplo, mARN. Los polinucleótidos pueden incluir la totalidad de la región que codifica del cADN o pueden representar una porción de la región que codifica del cADN.

La presente invención también suministra genes que corresponden a las secuencias de cADN divulgadas en esta memoria. Los correspondientes genes pueden ser aislados de acuerdo con métodos conocidos usando la información de secuencia divulgada en esta memoria. Tales métodos incluyen la preparación de sondas o cebadores de la información de secuencia divulgada, para identificación y/o amplificación de genes en bibliotecas genómicas apropiadas u otras fuentes de materiales genómicos. Además, puede obtenerse la secuencia 5' y 3' usando métodos conocidos en la técnica por ejemplo, pueden obtenerse cADN de longitud completa o ADN genómico que corresponde a cualquiera de los polinucleótidos de la invención, discriminando bibliotecas apropiadas de cADN o ADN genómico bajo condiciones adecuadas de hibridación, usando como sonda cualquiera de los polinucleótidos de la invención o una porción de ellos. De modo alternativo, los polinucleótidos de la invención pueden ser usados como la base para cebador(es) adecuado(s) que permitan la identificación y/o amplificación de genes en bibliotecas adecuadas de ADN genómico o cADN.

Las secuencias de ácido nucleico de la invención pueden ser ensambladas a partir de ESTs y secuencias (incluyendo secuencias de cADN y genómicas) obtenidas de una o más bases de datos públicas, tales como dbEST, gbpr, y UniGene. Las secuencias EST pueden suministrar información de secuencia de identificación, información de fragmento representativo o de segmento, o información de segmento novedoso para la totalidad de la longitud del gen.

MtCpn60.1 puede ser clonada y expresada usando los métodos descritos en T.H. Kong et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 1993, 90, 2608-2612 y J.C. Lewthwaite et al, Infection and Immunity, 2001, 69(12), 7349-7355. MtCpn60.1 está disponible comercialmente de Lionex (Alemania).

Los péptidos de la presente invención pueden ser preparados y/o aislados usando métodos convencionales conocidos en la técnica. Por ejemplo, mediante síntesis en solución o fase sólida usando métodos tradicionales o usando un sintetizador automatizado en fase sólida, por ejemplo como se describe en I. Coin, Nature Protocols, 2007, 2, 3247-3256. Preferiblemente, los péptidos de la presente invención son preparados mediante síntesis en fase sólida Fmoc usando métodos análogos a aquellos descritos en G.B. Fields y R.L. Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 1990, 35(3), 161-214.

De acuerdo con un aspecto adicional de la presente invención, se suministra una molécula de péptido o de ácido nucleico como se define en esta memoria, para uso en medicina.

En una realización, la invención suministra el uso de una molécula de péptido o ácido nucleico como se define en esta memoria, para la modulación de diapedesis, es decir movimiento o paso de células sanguíneas, preferiblemente células sanguíneas blancas, a través de las paredes capilares intactas hacia los alrededores del tejido corporal, en un sujeto humano.

Las moléculas de péptido y ácido nucleico de la presente invención están indicadas también como útiles en la prevención y/o tratamiento de cualquier condición, enfermedad y/o desorden en un sujeto humano que está asociada con un incremento en el flujo de células sanguíneas blancas, a través del endotelio. Ejemplos de tales condiciones incluyen, pero no están limitados a, condiciones inflamatorias agudas y/o crónicas tales como daño por isquemia-reperfusión (incluyendo trombosis coronaria y bloqueo de las arterias cerebrales), enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple, condiciones alérgicas tales como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad de altura.

Preferiblemente, la molécula de péptido o ácido nucleico de la presente invención es usada para el tratamiento y/o prevención de condiciones inflamatorias agudas y/o crónicas, en particular inflamación no alérgica. Los ejemplos de condiciones inflamatorias que pueden ser prevenidas y/o tratadas con las moléculas de péptido o ácido nucleico de la presente invención incluyen condiciones asociadas con eosinofilia y/o neutrofilia. Los ejemplos preferidos de condiciones inflamatorias agudas y/o crónicas incluyen indicios asociados con infección (tales como choque séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), daño por isquemia-reperfusión incluyendo trombosis coronaria y bloqueo de la arteria cerebral, síndrome de choque de pulmón, letalidad de endotoxina, artritis (en particular artritis reumatoide o artritis inflamatoria crónica), rechazo hiperagudo mediado por complemento, nefritis, daño de pulmón inducido por citoquina o quimioquina, asma no alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.

También se describe un método para la prevención y/o tratamiento de una condición inflamatoria aguda y/o crónica, que comprende la administración a un mamífero, incluyendo el hombre, de una molécula de péptido o ácido nucleico, como se define en esa memoria.

Además, se describe el uso de una molécula de péptido o ácido nucleico como se describe en esta memoria en la manufactura de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una condición inflamatoria aguda y/o crónica.

En una realización alternativa, la presente invención suministra el uso de una molécula de péptido o ácido nucleico como se define en esta memoria, para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

En una realización alternativa, la presente invención suministra el uso de una molécula de péptido o ácido nucleico como se define en esta memoria, para la prevención y/o tratamiento de desórdenes autoinmunes.

Dentro del término "desórdenes autoinmunes" como se usa en esta memoria se incluyen condiciones donde puede mostrarse que el proceso autoinmune contribuye a la patogénesis de una enfermedad. Tales desórdenes están asociados típicamente con una respuesta inmune tipo linfocito-1 ayudador T (Th-1).

Los ejemplos de desórdenes autoinmunes que pueden ser prevenidos y/o tratados con las moléculas de péptido o ácido nucleico de la presente invención incluyen desórdenes autoinmunes, tales como anemia hemolítica, trombocitopenia, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia gravis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, encefalitis autoinmune, enfermedad del tejido conectivo, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmune, miastenia gravis, enfermedad de injerto-versus-huésped y enfermedad inflamatoria autoinmune del ojo. los desórdenes autoinmunes preferidos incluyen artritis reumatoide y esclerosis múltiple.

Los efectos inmunosupresores de las moléculas de péptido o ácido nucleico de la presente invención contra la artritis reumatoide pueden ser determinados en un sistema de modelo experimental animal. El sistema de modelo experimental es artritis inducida con adyuvante en ratas, y el protocolo es descrito por J. Holoshitz, et al., 1983, Science, 219:56, o por B. Waksman et al., 1963, Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., 23:129. la inducción de la enfermedad puede ser causada por una inyección individual, generalmente intradérmica, de una suspensión de *Mycobacterium tuberculosis* muerto en adyuvante completo de Freund (CFA). La ruta de inyección puede variar, pero las ratas pueden ser inyectadas en la base de la cola con una mezcla adyuvante. El polipéptido es administrado en solución amortiguada de fosfato (PBS) a una dosificación de aproximadamente 1-5 mg/kg. El control consiste en administrar solamente PBS.

El procedimiento para probar los efectos del compuesto de prueba consistiría en la inyección intradérmica de *Mycobacterium tuberculosis* muerto en CFA seguido por la administración inmediata del compuesto de prueba y subsiguiente tratamiento día de por medio, hasta el día 24. En los días 14, 15, 18, 20, 22, y 24 después de la inyección de *Mycobacterium* CFA, puede obtenerse una calificación total de artritis, como describió J. Holoskitz anteriormente. Un análisis de los datos revelaría que el compuesto de prueba tendría un efecto dramático sobre el hinchamiento de las articulaciones, como se mide por un descenso en la calificación de artritis.

En una realización alternativa, la presente invención suministra el uso de una molécula de péptido o ácido nucleico como se define en esta memoria, para la prevención y/o tratamiento de condiciones de alergia. Los ejemplos de condiciones y desórdenes alérgicos que pueden ser prevenidos y/o tratados con las moléculas de péptido o ácido nucleico de la presente invención incluyen eczema, dermatitis, rinitis alérgica (fiebre del heno), enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, síndrome hipereosinofílico, dermatitis de contacto; enfermedades respiratorias caracterizadas por inflamación eosinofílica de vías respiratorias e hiperrespuesta de las vías respiratorias, tales como asma, incluyendo asma alérgica y asma intrínseca, aspergillosis broncopulmonar alérgica, neumonía eosinofílica, bronquiectasia por bronquitis alérgica, asma ocupacional, síndrome de enfermedad reactiva de vías respiratorias, enfermedad intersticial del pulmón, síndrome hipereosinofílico, enfermedad parasítica del pulmón; anafilaxis, enfermedad del suero, reacciones a los fármacos, alergias alimentarias, alergias al veneno de los

insectos, mastocitosis, pneumonitis hipersensible, urticaria, angioedema, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgico, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis venérea y conjuntivitis papilar gigante.

- 5 Otras condiciones en las cuales es deseada la supresión inmune (incluyendo, por ejemplo, trasplante de órganos), pueden ser tratables también usando una molécula de péptido o ácido nucleico de la presente invención. los desórdenes y condiciones alérgicos preferidos incluyen asma, rinitis alérgica, eczema y anafilaxis.

- 10 Dentro de los términos “desórdenes alérgicos” y “condiciones alérgicas” como se usa en esta memoria se incluyen condiciones asociadas con una respuesta inmune tipo linfocito-2 (Th-2) ayudador T. En la reacción alérgica, ocurren elevados niveles de IgE y predominan las respuestas inmunes a Th-2 sobre las respuestas Th-1, dando como resultado la respuesta inflamatoria.

- 15 Los efectos terapéuticos de los polipéptidos o antagonistas de ellos sobre reacciones alérgicas, pueden ser evaluados mediante modelos animales *in vivo* como la prueba de mejora por contacto acumulado (Lastborn et al., Toxicology 125: 59-66, 1998), prueba de pinchazo en la piel (Hoffmann et al., Allergy 54: 446-54, 1999), prueba de sensibilización de piel en cobayos (Vohr et al., Arch. Toxicol. 73: 501-9), y ensayo de nodo de linfa local de murina (Kimber et al., J. Toxicol. Environ. Health 53: 563-79).

- 20 Los ensayos adecuados para citotoxicidad de timocitos o esplenocitos incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Current Protocols in Immunology, Ed by J. E. Coligan et al., Strober, Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 3, *in vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Herrmann et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2488-2492, 1981; Herrmann et al., J. Immunol. 128:1968-1974, 1982; Handa et al., J. Immunol. 135:1564-1572, 1985; Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bowman et al., J. Virology 61:1992-1998; Bertagnolli et al., Cellular Immunology 133:327-341, 1991; Brown et al., J. Immunol. 153:3079-3092, 1994.

- 30 Los ensayos para respuestas de inmunoglobulina dependiente de células T e intercambio de isotipo (que identificarán, entre otros, proteínas que modulan la respuesta de anticuerpo dependiente de células T y que afectan los perfiles Th1/Th2) incluyen, sin limitación, aquellos descritos en: Maliszewski, J. Immunol. 144:3028-3033, 1990; y Assays for B cell function: *in vitro* antibody production, Mond, J. J. y Brunswick, M. en Current Protocols in Immunology. J. E. Coligan et al., eds. vol 1 pp. 3.8.1-3.8.16, John Wiley and Sons, Toronto. 1994.

- 35 Los ensayos de reacción mixta de linfocito (MLR) (que identificarán, entre otras, proteínas que generan predominantemente respuestas a Th1 y CTL) incluyen, sin limitación, aquellas descritas en: Current Protocols in Immunology, ed. por J. E. Coligan et al., Pub. Greene Publishing Associates y Wiley-Interscience (capítulo 3, *In vitro* assays for Mouse Lymphocyte Function 3.1-3.19; capítulo 7, Immunologic studies in Humans); Takai et al., J. Immunol. 137:3494-3500, 1986; Takai et al., J. Immunol. 140:508-512, 1988; Bertagnolli et al., J. Immunol. 149:3778-3783, 1992.

- 40 Los ensayos dendríticos dependientes de célula (que identificarán, entre otras, proteínas expresadas por células dendríticas que activan células T ingenuas) incluyen, sin limitación, aquellas descritas en: Guery et al., J. Immunol. 134:536-544, 1995; Inaba et al., J. Experimental Medicine 173:549-559, 1991; Macatonia et al., J. Immunol. 154:5071-5079, 1995; Porgador et al., J. Experimental Medicine 182:255-260, 1995; Nair et al., J. Virology 67:4062-4069, 1993; Huang et al., Science 264:961-965, 1994; Macatonia et al., J. Experimental Medicine 169:1255-1264, 1989; Bhardwaj et al., J. Clinical Investigation 94:797-807, 1994; y Inaba et al., J. Experimental Medicine 172:631-640, 1990.

- 50 Los ensayos para supervivencia/apoptosis de linfocitos (que identificarán, entre otras, proteínas que previenen la apoptosis después de inducción de superantígeno y proteínas que regulan la homeostasis de linfocitos) incluyen, sin limitación, aquellas descritas en: Darzynkiewicz et al., Cytometry 13:795-808, 1992; Gorczyca et al., Leukemia 7:659-670, 1993; Gorczyca et al., Cancer Research 53:1945-1951, 1993; Itoh et al., Cell 66:233-243, 1991; Zacharchuk, J. Immunol. 145:4037-4045, 1990; Zamai et al., Cytometry 14:891-897, 1993; Gorczyca et al., Int. J. Oncol. 1:639-648, 1992.

- 55 Los ensayos para proteínas que influyen en los pasos previos de compromiso y desarrollo de célula T incluyen, sin limitación aquellos descritos en: Antica et al., Blood 84:111-117, 1994; Fina et al., Cellular Immunology 155:111-122, 1994; Galy et al., Blood 85:2770-2778, 1995; Toki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7548-7551, 1991.

- 60 Como se usa en esta memoria “tratamiento” indica la reducción, alivio o eliminación de uno o más síntomas de la condición que está siendo tratada, respecto a los síntomas previos al tratamiento. Por ejemplo, síntomas que pueden ser afectados incluyen eosinofilia, reducción en la secreción de citoquinas particulares, una respuesta inmune basada en Th2, respuesta alérgica y la presencia de autoanticuerpos.

- 65 Como se usa en esta memoria “prevención” indica el retardo o prevención del inicio de una condición o reducción de su severidad, como se evalúa por la aparición o extensión de uno o más síntomas de dicha condición.

En un aspecto adicional, la invención suministra una composición farmacéutica que comprende o que consiste en una molécula de péptido o ácido nucleico de la presente invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser entregadas usando un sistema de entrega de fármaco inyectable de liberación sostenida. Estos son diseñados específicamente para reducir la frecuencia de las inyecciones. Un ejemplo de tal sistema es Nutropin Depot, el cual encapsula la hormona recombinante de crecimiento humano (rhGH) en microesferas biodegradables que, una vez inyectadas, liberan rhGH lentamente sobre un periodo sostenido. Preferiblemente, la entrega es ejecutada por vía intramuscular (i.m.) y/o subcutánea (s.c.) y/o intravenosa (i.v.).

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas mediante un dispositivo implantado quirúrgicamente, que libera el fármaco directamente en el sitio requerido. Por ejemplo, Vitrasert libera ganciclovir directamente dentro del ojo para tratar retinitis CMV. La aplicación directa de este agente tóxico en el sitio de la enfermedad, logra terapia efectiva sin los efectos laterales sistémicos significativos del fármaco.

Los sistemas de terapia de electroevaporación (EPT) pueden ser empleados también para la administración de los agentes, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención. Un dispositivo que entrega un campo eléctrico pulsante a las células aumenta la permeabilidad de las membranas celulares, frente al fármaco, dando como resultado una mejora significativa de la entrega intracelular del fármaco.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser entregadas también mediante electroincorporación (EI). La EI ocurre cuando pequeñas partículas de hasta 30 micrones de diámetro sobre la superficie de la piel, experimentan pulsos eléctricos o similares a aquellos usados en la electroevaporación. En la EI, estas partículas son conducidas a través del stratum corneum y dentro de las capas más profundas en la piel. Las partículas pueden ser cargadas o recubiertas con fármacos o genes o simplemente pueden actuar como "balas" que generan poros en la piel, a través de los cuales pueden entrar los fármacos.

Un método alternativo para la entrega de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención es el sistema inyectable ReGel que es termosensible. Por debajo de la temperatura corporal, ReGel es un líquido inyectable, mientras a temperatura ambiente forma inmediatamente un reservorio de gel que se erosiona lentamente y se disuelve dentro de polímeros biodegradables conocidos, seguros. La sustancia activa es entregada a lo largo del tiempo, a medida que el biopolímero se disuelve.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser entregadas también oralmente. El proceso puede emplear un proceso natural para la ingesta oral de vitamina B₁₂ y/o vitamina D en el cuerpo para coentrega de proteínas y péptidos. Montando en el sistema de ingesta de vitamina B₁₂ y/o vitamina D, los ácidos nucleicos, moléculas y formulaciones farmacéuticas de la invención pueden moverse a través de la pared intestinal. Se sintetizan complejos entre análogos de vitamina B₁₂ y/o análogos de vitamina D y el fármaco, que retienen tanto la afinidad significativa por el factor intrínseco (IF) en la porción de vitamina B₁₂/porción de vitamina D del complejo como la bioactividad significativa de la sustancia activa del complejo.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser introducidos en las células mediante "péptidos troyanos". Estos son una clase de polipéptidos denominados penetratinas que tienen propiedades de translocación y son capaces de llevar compuestos hidrofílicos a través de la membrana plasmática. Este sistema permite la focalización directa de oligopéptidos al citoplasma y núcleo, y puede ser no específico del tipo de célula y altamente eficiente. Véase Derossi et al. (1998), Trends Cell Biol 8, 84-87.

Preferiblemente, el medicamento y/o composición farmacéutica de la presente invención es una unidad de dosificación que contiene una dosificación diaria o unitaria, subdosificación diaria o una fracción apropiada de ella, del ingrediente activo.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención serán administradas normalmente en forma oral o mediante cualquier ruta parenteral, en la forma de una composición farmacéutica que comprende el ingrediente activo, opcionalmente en la forma de un ácido o base orgánico o inorgánico, sal de adición, no tóxico, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Dependiendo del desorden y el paciente que va a ser tratado, así como la ruta administración, las composiciones pueden ser administradas en dosificaciones variables.

En terapia humana, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados solos, pero generalmente serán administrados en mezcla con un excipiente farmacéutico, diluyente o vehículo adecuado, seleccionado de acuerdo a la ruta pretendida de administración y práctica farmacéutica estándar.

Por ejemplo, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas en forma oral, bucal o sublingual en la forma de comprimidos, cápsulas, óvulos, elixires, soluciones o suspensiones, que pueden contener agentes saborizantes o colorantes, para aplicaciones de liberación inmediata, retrasada o

controlada. Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados también mediante inyección vía intracavernosa.

Tales comprimidos pueden contener excipientes tales como celulosa microcristalina, lactosa, citrato de sodio, carbonato de calcio, fosfato dibásico de calcio y glicina, agentes de desintegración tales como almidón (preferiblemente almidón de maíz, patata o tapioca), glicolato de almidón de sodio, croscarmelosa de sodio y ciertos silicatos complejos, y aglutinantes y granulaciones tales como polivinilpirrolidona, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), hidroxipropilcelulosa (HPC), sacarosa, gelatina y acacia. Adicionalmente, pueden incluirse agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico, behenato de glicerilo y talco.

Pueden emplearse también composiciones sólidas de un tipo similar, como agentes de relleno en cápsulas de gelatina. Los excipientes preferidos a este respecto incluyen lactosa, almidón, celulosa, azúcar de leche o polietilenglicoles de alto peso molecular. Para suspensiones acuosas y/o elixires, los agentes de la invención pueden ser combinados con diferentes agentes edulcorantes o saborizantes, materia colorante o pigmentos, con agentes emulsificantes y/o agentes de suspensión y con diluyentes tales como agua, etanol, propilenglicol y glicerina, y combinaciones de ellos.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administrados también por vía parenteral, por ejemplo, de modo intravenoso, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intraesternal, intracraneal, intramuscular o subcutánea, o pueden ser administrados mediante técnicas de infusión. Son mejor usadas en la forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas deberían estar amortiguadas de manera adecuada (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones parenterales adecuadas bajo condiciones estériles es lograda fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los medicamentos y composiciones farmacéuticas adecuados para administración parenteral incluyen soluciones para inyección acuosas y no acuosas, estériles, que pueden contener antioxidantes, amortiguadores, bacteriostáticos y solutos, que hacen a la formulación isotónica respecto a la sangre del receptor pretendido; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Los medicamentos y composiciones pueden ser presentados en contenedores de dosificación unitaria o de varias dosificaciones, por ejemplo ampollas y viales cerrados, y pueden ser almacenados en una condición seca por congelación (liofilizados) requiriendo solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las soluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden ser preparadas a partir de polvos granulosos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

Para administración oral y parenteral para pacientes humanos, el nivel diario de dosificación de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención será usualmente de 0.1 a 100 mg por adulto por día, administrado en dosificaciones individuales o divididas.

Así, por ejemplo, los comprimidos o cápsulas de las moléculas de la invención pueden contener de 0.1 mg a 100 mg de agente activo para administración individualmente o dos o más a la vez, según sea apropiado. En cualquier evento, el médico determinará la dosificación real que será la más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, peso y respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso promedio. Desde luego, puede haber casos individuales donde ameritan intervalos de dosificación mayor o menor y ellos están dentro del alcance de esta invención.

Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas también por vía intranasal o mediante inhalación y son entregadas de manera conveniente en la forma de un inhalador de polvo seco o una presentación de atomizador en aerosol desde un contenedor a presión, bomba atomizador o nebulizador con el uso de un agente propelente adecuado, por ejemplo diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, un hidrofluoroalcano tal como 1,1,1,2-tetrafluoroetano (HFA 134A3 o 1,1,1,2,3,3,3-heptafluoropropano (HFA 227EA3), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol a presión, la unidad de dosificación puede ser determinada suministrando una válvula para entregar una cantidad medida. El contenedor a presión, bomba, atomizador o nebulizador puede contener una solución o suspensión del agente activo, por ejemplo usando una mezcla de etanol y el agente propelente como el solvente, que puede contener adicionalmente un lubricante, por ejemplo trioleato de sorbitano. Las cápsulas y cartuchos (hechos, por ejemplo, de gelatina) para uso en un inhalador o para insuflar, pueden ser formulados para contener una mezcla en polvo de un agente de la invención y una base en polvo adecuada, tal como lactosa o almidón.

Las formulaciones en aerosol o polvo seco son arregladas preferiblemente de modo que cada dosificación o "puff" contiene por lo menos 0.1 mg de una molécula de la invención para entregar al paciente. Se notará que la dosificación total diaria con un aerosol variará de paciente a paciente, y puede ser administrada en una dosificación individual o, más usualmente, a través del día en dosificaciones divididas.

De modo alternativo, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas en la forma de un supositorio o pesario, o pueden ser aplicadas de manera tópica en la forma de una loción, solución, crema, gel, ungüento o polvo para espolvorear. Las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser administradas también por vía transdérmica, por ejemplo, mediante el uso de un parche en la piel. Pueden ser administradas también por la ruta ocular, particularmente para el tratamiento de enfermedades del ojo.

Para uso oftálmico, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas como suspensiones micronizadas en soluciones salinas isotónicas, con pH ajustado, estériles, o, preferiblemente, como soluciones en soluciones salinas isotónicas, con pH ajustado, estériles, opcionalmente en combinación con un agente conservante tal como cloruro de bencilalconio. De modo alternativo, pueden ser formuladas en ungüento tal como un petrolato.

Para aplicación tópica en la piel, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser formuladas como un ungüento adecuado que contiene el agente activo suspendido o disuelto en, por ejemplo, una mezcla con uno o más de los siguientes: aceite mineral, petrolato líquido, petrolato blanco, propilenglicol, agentes de polioxietileno polioxipropileno, cera emulsificante y agua. De modo alternativo, pueden ser formuladas como una loción o crema adecuadas, suspendidas o sueltas en, por ejemplo, una mezcla de uno o más de los siguientes: aceite mineral, monoestearato de sorbitano, un polietilenglicol, parafina líquida, Polysorbate 60, cera de cetil ésteres, cetearil alcohol, 2-octildodecanol, bencil alcohol y agua.

Las formulaciones adecuadas para la administración tópica en la boca incluyen pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base saborizada, usualmente sacarosa y acacia o tragacanto; pastillas que comprenden el ingrediente activo en una base inerte tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia; y enjuagues bucales que comprenden el ingrediente activo en un vehículo líquido adecuado.

Generalmente, en humanos, la administración oral o parenteral de las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de los agentes de la invención es la ruta preferida, siendo la más conveniente.

Para uso veterinario, las moléculas, medicamentos y composiciones farmacéuticas de la invención son administradas como una formulación aceptable adecuada, de acuerdo con la práctica veterinaria normal, y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y ruta de administración que serán los más apropiados para un animal particular.

De manera conveniente, la formulación es una formulación farmacéutica. De manera ventajosa, la formulación es una formulación veterinaria.

De manera ventajosa, en el uso de acuerdo con la invención, el nivel de dosificación diaria será de 0.0001 a 100,000 mg, administrada en dosificaciones individuales o divididas; preferiblemente, el nivel de dosificación diaria es 0.0001 a 1000 mg.

Las formulaciones farmacéuticas preferidas incluyen aquellas en las cuales el ingrediente activo está presente en por lo menos 1% (tal como por lo menos 10%, preferiblemente en por lo menos 30% y más preferiblemente en por lo menos 50%) en peso. Esto es, la relación de ingrediente activo a los otros componentes (es decir la adición de adyuvante, diluyente y vehículo) de la composición farmacéutica es por lo menos 1:99 (por ejemplo por lo menos 10:90, preferiblemente por lo menos 30:70 y más preferiblemente por lo menos 50:50) en peso.

Típicamente, el tiempo entre administración de dosificaciones al paciente está entre seis y doce horas; en una realización preferida, el tiempo entre administración de dosificaciones al paciente está entre nueve y doce horas después de la dosificación previa; más preferiblemente, el tiempo entre administración de dosificaciones al paciente está entre doce horas y doce días; incluso más preferiblemente, el tiempo entre administración de dosificaciones al paciente está entre doce días y seis meses.

En una realización preferida, la invención suministra un uso en el que el medicamento de la invención es usado para aliviar el dolor en un paciente humano o animal.

Preferiblemente, la composición farmacéutica o el medicamento de la invención son formulados para permitir la administración mediante por lo menos una ruta seleccionada del grupo que comprende o consiste en: rutas intranasal; oral; parenteral; tópica; oftálmica; supositorio; pesario; o inhalación. Las formulaciones adecuadas para tales rutas de administración son bien conocidas por aquellos en la técnica de la farmacia y medicina, y ejemplos de formulaciones fueron descritos anteriormente y se describen en los ejemplos acompañantes.

En un aspecto adicional, la invención suministra el uso de una molécula de péptido de acuerdo con la invención y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención, como un adyuvante.

El término “adyuvante” indica cualquier sustancia que, cuando es incorporada dentro o administrada simultáneamente con antígeno, potencia la respuesta inmune.

En un aspecto adicional, la invención suministra un sistema adyuvante que comprende (i) una molécula de péptido de acuerdo con la invención y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención y (ii) un antígeno.

Preferiblemente, el antígeno es seleccionado del grupo que comprende o consiste en: antígeno de ántrax; antígeno de cólera; antígeno de difteria; antígeno de influenza b (Hib); antígeno de hepatitis A; antígeno de hepatitis B; antígeno de influenza; antígeno de encefalitis japonesa; antígeno de sarampión, paperas y rubéola (MMR); antígeno contra el meningococo; antígeno de la tosferina; antígeno del pneumococo; antígeno de la poliomielitis; antígeno de la rabia; antígeno en la rubéola; antígeno de la viruela y/o vaccinia; antígeno del tétano; antígeno de encefalitis transmitida por garrapatas; antígeno de tuberculosis; antígeno tifoide; antígeno de varicela/herpes zoster; antígeno de fiebre amarilla; y antígeno de vaccina veterinaria.

Descripción de las figuras

Figura 1

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis*.

Figura 2

Péptidos que cubren el dominio ecuatorial de chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis*.

Figura 3

Efecto de fragmentos de péptido de chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis* en un modelo de lipopolisacárido (LPS) de inflamación no alérgica.

Ejemplos

En los ejemplos se usan las siguientes abreviaturas, para referirse a péptidos de la presente invención:

F1 - DGSVVVNKVSELPAGH

F2 - GLNVNTLSYGDLAAD

F3 - SELPAGHGLNVNTLS

Sección experimental

Se sintetizaron y se aislaron los péptidos F1-F3 de acuerdo con los siguientes procedimientos:

F1

El péptido fue sintetizado sobre resina Fmoc-His(trt)-Wang LL (200mg) de Merck Chemicals. Para añadir los residuos remanentes de aminoácido, se usó un equipo para síntesis Protein Technologies Symphony Automated. Todas las reacciones de acoplamiento fueron acoplamientos dobles de 10 minutos con agente de acoplamiento HBTU. El péptido fue escindido en ácido trifluoroacético al 100 % en presencia de una mezcla de captación que contenía 1:1 v/v de triisopropilsilano:agua. El péptido fue purificado sobre una columna LC-ABZ+ (Supelcosil), con tamaño de partícula de 5 micrones, tamaño de poro de 110 Angstrom, 250 mm x 10 mm, de Supelco. El análisis fue ejecutado con los mismos amortiguadores, pero usando una columna C-18, de 3.5 micrones, tamaño de poro de 90 angstrom, 4.6mm X 150 mm, de Agilent. Las condiciones de carrera fueron:

Absorción 216 nm, tasa de flujo 1 mL/ min

t=0, 0% B

t=2, 0% B

t=22, 80% B

% de rendimiento = 31%

F2

El péptido fue sintetizado sobre resina Fmoc-Asp(OtBu)-Wang LL (150mg) de Merck Chemicals. Para añadir los residuos remanentes de aminoácido, se usó un equipo para síntesis Protein Technologies Symphony Automated. Todas las reacciones de acoplamiento fueron acoplamientos dobles de 10 minutos con agente de acoplamiento HBTU. El péptido fue escindido en ácido trifluoroacético al 100 % en presencia de una mezcla de captación que contenía 1:1 v/v de triisopropilsilano:agua. El péptido fue purificado sobre una columna LC-ABZ+ (Supelcosil), con tamaño de partícula de 5 micrones, tamaño de poro de 110 Angstrom, 250 mm x 10 mm, de Supelco. El análisis fue ejecutado con los mismos amortiguadores, pero usando una columna C-18, de 3.5 micrones, tamaño de poro de 90 angstrom, 4.6mm X 150 mm, de Agilent. Las condiciones de carrera fueron:

10 Absorción 216 nm, tasa de flujo 1 mL/ min

t=0, 0% B

t=2, 0% B

15 t=22, 80% B

% de rendimiento = 23%

20 F3

El péptido fue sintetizado sobre resina Fmoc-Ser(tBu)-Wang LL (150mg) de Merck Chemicals. Para añadir los residuos remanentes de aminoácido, se usó un equipo para síntesis Protein Technologies Symphony Automated. Todas las reacciones de acoplamiento fueron acoplamientos dobles de 10 minutos con agente de acoplamiento HBTU. El péptido fue escindido en ácido trifluoroacético al 100 % en presencia de una mezcla de captación que contenía 1:1 v/v de triisopropilsilano:agua. El péptido fue purificado sobre una columna LC-ABZ+ (Supelcosil), con tamaño de partícula de 5 micrones, tamaño de poro de 110 Angstrom, 250 mm x 10 mm, de Supelco. El análisis fue ejecutado con los mismos amortiguadores, pero usando una columna C-18, de 3.5 micrones, tamaño de poro de 90 angstrom, 4.6mm X 150 mm, de Agilent. Las condiciones de carrera fueron:

30 Absorción 216 nm, tasa de flujo 1 mL/ min

t=0, 0% B

35 t=2, 0% B

t=22, 80% B

% de rendimiento = 34%

40 Ejemplo 1

Efecto de fragmentos F1, F2 y F3 de péptido en un modelo de lipopolisacárido (LPS) de una inflamación no alérgica

45 Propósito

El propósito de estos experimentos fue determinar si los péptidos F1, F2 y F3 son capaces de inhibir el reclutamiento de neutrófilos en un sistema *in vivo*.

50 Método

Se trataron previamente ratones hembra Balb/c (Charles River, Reino Unido) por vía intranasal con F1, F2 o F3 (5pg o 0.5pg). Después de 15 minutos, se administró por vía intranasal LPS (25 µg). Se determinó el influjo de neutrófilos en los pulmones, mediante lavado broncoalveolar 4 horas más tarde.

55 Resultados

En la figura 3 se resumen los resultados obtenidos. LPS indujo un incremento en los neutrófilos dependiente de la dosificación, comparado con el control. Se observó un descenso significativo en la migración de neutrófilos hacia el pulmón, para todos los péptidos F1 - F3, a ambas concentraciones de dosificación.

60 Conclusiones

Los péptidos de la presente invención (F1 - F3) han mostrado inhibir la migración celular *in vivo* de neutrófilos. La actividad biológica observada indica un efecto antiinflamatorio directo en inflamación no alérgica.

65

Listado de secuencia

<110> Peptinnovate Limited

5 <120> Péptidos novedosos

<130> P045177PCT

<150> GB 1118201.1

10 <151> 2011-10-21

<160> 19

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 31

20 <212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

25 <400> 1

Asp Gly Ser Val Val Val Asn Lys Val Ser Glu Leu Pro Ala Gly His
1 5 10 15

Gly Leu Asn Val Asn Thr Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Asp
20 25 30

<210> 2

30 <211> 16

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido (fragmento del péptido 4)

40 <400> 2

Asp Gly Ser Val Val Val Asn Lys Val Ser Glu Leu Pro Ala Gly His
1 5 10 15

45 <210> 3

<211> 15

<212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Péptido (fragmento del péptido 4)

<400> 3

Gly Leu Asn Val Asn Thr Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Asp
1 5 10 15

<210> 4
 <211> 15
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido (fragmento del péptido 4)
 <400> 4
 15 Ser Glu Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Val Asn Thr Leu Ser
 1 5 10 15
 <210> 5
 20 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25 <220>
 <223> Péptido (fragmento del péptido 4)
 30 <400> 5
 Asp Gly Ser Val Val Val Asn Lys Val Ser
 1 5 10
 <210> 6
 35 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido (fragmento del péptido 4)
 45 <400> 6
 Glu Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Val
 1 5 10
 50 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 60 <223> Péptido (fragmento del péptido 4)
 <400> 7

ES 2 770 438 T3

Asn Thr Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Asp
 1 5 10

<210> 8
 5 <211> 29
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 10 <220>
 <223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)
 15 <400> 8

Met Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Asp Glu Thr Ala Arg Arg Ala Met Glu
 1 5 10 15
 Val Gly Met Asp Lys Leu Ala Asp Thr Val Arg Val Thr
 20 25

20 <210> 9
 <211> 21
 25 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)
 <400> 9

Leu Gly Pro Arg Gly Arg His Val Val Leu Ala Lys Ala Phe Gly Gly
 1 5 10 15
 Pro Thr Val Thr Asn
 20

35 <210> 10
 <211> 33
 40 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)
 <400> 10
 50

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

<210> 11

<211> 28

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

<400> 11

15 Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ile Leu Ala Gln Ala Leu Ile
 1 5 10 15

 Lys Gly Gly Leu Arg Leu Val Ala Ala Gly Val Asn
 20 25

<210> 12

20 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

30 <400> 12

 Pro Ile Ala Leu Gly Val Gly Ile Gly Lys Ala Ala Asp Ala Val Ser
 1 5 10 15

 Glu Ala Leu Leu Ala Ser Ala Thr Pro
 20 25

<210> 13

35 <211> 27

<212> PRT

40 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

45 <400> 13

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

 Arg Lys Ala Leu Thr Glu Leu Arg Ala Ser Leu
 20 25

50 <210> 14

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

10 <400> 14

Thr	Gly	Asp	Glu	Val	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala
1				5				10						15	
Ala	Pro	Leu	Phe	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Leu				
			20					25							

<210> 15

15 <211> 31

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

25 <400> 15

Gly	Val	Ile	Asp	Pro	Val	Lys	Val	Thr	Arg	Ser	Ala	Val	Leu	Asn	Ala
1				5				10						15	
Ser	Ser	Val	Ala	Arg	Met	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Val	Val	
			20					25					30		

30 <210> 16

<211> 25

<212> PRT

35 <213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Péptido (fragmento de MtCpn60.1)

<400> 16

Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Val	Val	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Ala	Glu	Asp
1				5				10						15	
His	Asp	His	His	His	Gly	His	Ala	His							
			20					25							

45 <210> 17

<211> 1620

50 <212> ADN

<213> Mycobacterium tuberculosis

<220>

<221> CDS

5

<222> (1).(1620)

<400> 17

atg agc aag ctg atc gaa tac gac gaa acc gcg cgt cgc gcc atg gag	48
Met Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Asp Glu Thr Ala Arg Arg Ala Met Glu	
1 5 10 15	
gtc ggc atg gac aag ctg gcc gac acc gtg cgg gtg acg ctg ggg ccg	96
Val Gly Met Asp Lys Leu Ala Asp Thr Val Arg Val Thr Leu Gly Pro	
20 25 30	
cgc ggc cgg cat gtg gtg ctg gcc aag gcg ttt ggc gga ccc acg gtt	144
Arg Gly Arg His Val Val Leu Ala Lys Ala Phe Gly Gly Pro Thr Val	
35 40 45	
acc aac gac ggc gtc acg gtg gca cgt gag atc gag ctg gaa gat ccg	192
Thr Asn Asp Gly Val Thr Val Ala Arg Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro	
50 55 60	
ttt gaa gac ttg ggc gcc cag ctg gtg aag tcg gtg gcc acc aag acc	240
Phe Glu Asp Leu Gly Ala Gln Leu Val Lys Ser Val Ala Thr Lys Thr	
65 70 75 80	
aac gat gtg gcc ggt gac ggc acc acc acc gca acc atc ttg gcg cag	288
Asn Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Ile Leu Ala Gln	
85 90 95	

10

ES 2 770 438 T3

gca ctg atc aag ggc ggc ctg agg cta gtg gcc gcc ggc gtc aac ccg Ala Leu Ile Lys Gly Gly Leu Arg Leu Val Ala Ala Gly Val Asn Pro 100 105 110	336
atc gcg ctc ggc gtg gga atc ggc aag gcc gcc gac gcg gta tcc gag Ile Ala Leu Gly Val Gly Ile Gly Lys Ala Ala Asp Ala Val Ser Glu 115 120 125	384
gcg ctg ctg gca tcg gcc acg ccg gtg tcc ggc aag acc ggc atc gcg Ala Leu Leu Ala Ser Ala Thr Pro Val Ser Gly Lys Thr Gly Ile Ala 130 135 140	432
cag gtg gcg acg gtg tcc tcg cgc gac gag cag atc ggt gac ctg gtt Gln Val Ala Thr Val Ser Ser Arg Asp Glu Gln Ile Gly Asp Leu Val 145 150 155 160	480
ggc gaa gcg atg agc aag gtc ggc cac gac ggc gtg gtc agc gtc gaa Gly Glu Ala Met Ser Lys Val Gly His Asp Gly Val Val Ser Val Glu 165 170 175	528
gaa tcc tcg acg ctg ggc acc gag ttg gag ttc acc gag ggt atc ggc Glu Ser Ser Thr Leu Gly Thr Glu Leu Glu Phe Thr Glu Gly Ile Gly 180 185 190	576
ttc gac aag ggc ttc ttg tcg gca tac ttc gtt acc gac ttc gat aac Phe Asp Lys Gly Phe Leu Ser Ala Tyr Phe Val Thr Asp Phe Asp Asn 195 200 205	624
cag cag gcg gtg ctc gag gac gcg ttg atc ctg ctg cac caa gac aag Gln Gln Ala Val Leu Glu Asp Ala Leu Ile Leu Leu His Gln Asp Lys 210 215 220	672
atc agc tcg ctt ccc gat ctg ttg cca ttg ctg gaa aag gtt gca gga Ile Ser Ser Leu Pro Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ala Gly 225 230 235 240	720
acg ggt aag cca cta ctg atc gtg gct gaa gac gtg gag ggc gaa gcg Thr Gly Lys Pro Leu Leu Ile Val Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala 245 250 255	768
ttg gcg acg ctg gtc gtc aac gcg att cgc aag acg ttg aaa gcg gtc Leu Ala Thr Leu Val Val Asn Ala Ile Arg Lys Thr Leu Lys Ala Val 260 265 270	816
gcg gtc aag ggg ccg tac ttc ggt gac cgc cgt aag gcg ttc ctt gag Ala Val Lys Gly Pro Tyr Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Phe Leu Glu 275 280 285	864
gac ctg gcg gtg gtg acg ggt ggc cag gtg gtc aac ccc gac gcc ggc Asp Leu Ala Val Val Thr Gly Gly Gln Val Val Asn Pro Asp Ala Gly 290 295 300	912
atg gtg ctg cgc gag gtg ggc ttg gag gtg ctg ggc tcg gcc cga cgc Met Val Leu Arg Glu Val Gly Leu Glu Val Leu Gly Ser Ala Arg Arg 305 310 315 320	960
gtg gtg gtc agc aag gac gac acg gtc att gtc gac ggc ggc ggc acc Val Val Val Ser Lys Asp Asp Thr Val Ile Val Asp Gly Gly Gly Thr 325 330 335	1008
gca gaa gcg gtg gcc aac cgc gcg aag cac ttg cgt gcc gag atc gac Ala Glu Ala Val Ala Asn Arg Ala Lys His Leu Arg Ala Glu Ile Asp 340 345 350	1056

ES 2 770 438 T3

```

aag agc gat tcg gat tgg gat cgg gaa aag ctt ggc gag cgg ctg gcc      1104
Lys Ser Asp Ser Asp Trp Asp Arg Glu Lys Leu Gly Glu Arg Leu Ala
355                                360                                365

aaa ctg gcc ggc ggg gtt gct gtc atc aag gtg ggt gcc gcc acc gag      1152
Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Val Gly Ala Ala Thr Glu
370                                375                                380

acc gca ctc aag gag cgc aag gaa agc gtc gag gat gcg gtc gcg gcc      1200
Thr Ala Leu Lys Glu Arg Lys Glu Ser Val Glu Asp Ala Val Ala Ala
385                                390                                395                                400

gcc aag gcc gcg gtc gag gag ggc atc gtc cct ggt ggg gga gcc tcg      1248
Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Pro Gly Gly Gly Ala Ser
405                                410                                415

ctc atc cac cag gcc cgc aag gcg ctg acc gaa ctg cgt gcg tcg ctg      1296
Leu Ile His Gln Ala Arg Lys Ala Leu Thr Glu Leu Arg Ala Ser Leu
420                                425                                430

acc ggt gac gag gtc ctc ggt gtc gac gtg ttc tcc gaa gcc ctt gcc      1344
Thr Gly Asp Glu Val Leu Gly Val Asp Val Phe Ser Glu Ala Leu Ala
435                                440                                445

gcg ccg ttg ttc tgg atc gcc gcc aac gct ggc ttg gac ggc tcg gtg      1392
Ala Pro Leu Phe Trp Ile Ala Ala Asn Ala Gly Leu Asp Gly Ser Val
450                                455                                460

gtg gtc aac aag gtc agc gag cta ccc gcc ggg cat ggg ctg aac gtg      1440
Val Val Asn Lys Val Ser Glu Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Val
465                                470                                475                                480

aac acc ctg agc tat ggt gac ttg gcc gct gac ggc gtc atc gac ccg      1488
Asn Thr Leu Ser Tyr Gly Asp Leu Ala Ala Asp Gly Val Ile Asp Pro
485                                490                                495

gtc aag gtg act agg tcg gcg gtg ttg aac gcg tca tcg gtt gcc cgg      1536
Val Lys Val Thr Arg Ser Ala Val Leu Asn Ala Ser Ser Val Ala Arg
500                                505                                510

atg gta ctc acc acc gag acg gtc gtg gtc gac aag ccg gcc aag gca      1584
Met Val Leu Thr Thr Glu Thr Val Val Val Asp Lys Pro Ala Lys Ala
515                                520                                525

gaa gat cac gac cat cac cac ggg cac gcg cac tga      1620
Glu Asp His Asp His His His Gly His Ala His
530                                535

```

<210> 18

5 <211> 539

<212> PRT

<213> Mycobacterium tuberculosis

10

<400> 18

```

Met Ser Lys Leu Ile Glu Tyr Asp Glu Thr Ala Arg Arg Ala Met Glu
1          5          10          15

Val Gly Met Asp Lys Leu Ala Asp Thr Val Arg Val Thr Leu Gly Pro
20          25          30

```

ES 2 770 438 T3

Arg	Gly	Arg	His	Val	Val	Leu	Ala	Lys	Ala	Phe	Gly	Gly	Pro	Thr	Val
35						40				45					
Thr	Asn	Asp	Gly	Val	Thr	Val	Ala	Arg	Glu	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro
50						55				60					
Phe	Glu	Asp	Leu	Gly	Ala	Gln	Leu	Val	Lys	Ser	Val	Ala	Thr	Lys	Thr
65				70						75				80	
Asn	Asp	Val	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Thr	Thr	Ala	Thr	Ile	Leu	Ala	Gln
				85				90						95	
Ala	Leu	Ile	Lys	Gly	Gly	Leu	Arg	Leu	Val	Ala	Ala	Gly	Val	Asn	Pro
		100						105				110			
Ile	Ala	Leu	Gly	Val	Gly	Ile	Gly	Lys	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Ser	Glu
		115				120						125			
Ala	Leu	Leu	Ala	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Lys	Thr	Gly	Ile	Ala
130						135				140					
Gln	Val	Ala	Thr	Val	Ser	Ser	Arg	Asp	Glu	Gln	Ile	Gly	Asp	Leu	Val
145				150						155				160	
Gly	Glu	Ala	Met	Ser	Lys	Val	Gly	His	Asp	Gly	Val	Val	Ser	Val	Glu
				165				170						175	
Glu	Ser	Ser	Thr	Leu	Gly	Thr	Glu	Leu	Glu	Phe	Thr	Glu	Gly	Ile	Gly
		180						185				190			
Phe	Asp	Lys	Gly	Phe	Leu	Ser	Ala	Tyr	Phe	Val	Thr	Asp	Phe	Asp	Asn
		195				200						205			
Gln	Gln	Ala	Val	Leu	Glu	Asp	Ala	Leu	Ile	Leu	Leu	His	Gln	Asp	Lys
210						215				220					
Ile	Ser	Ser	Leu	Pro	Asp	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu	Lys	Val	Ala	Gly
225				230						235				240	
Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Ala	Glu	Asp	Val	Glu	Gly	Glu	Ala
				245				250						255	
Leu	Ala	Thr	Leu	Val	Val	Asn	Ala	Ile	Arg	Lys	Thr	Leu	Lys	Ala	Val
		260				265						270			
Ala	Val	Lys	Gly	Pro	Tyr	Phe	Gly	Asp	Arg	Arg	Lys	Ala	Phe	Leu	Gln

ES 2 770 438 T3

275					280					285					
Asp	Leu	Ala	Val	Val	Thr	Gly	Gly	Gln	Val	Val	Asn	Pro	Asp	Ala	Gly
290						295					300				
Met	Val	Leu	Arg	Glu	Val	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	Arg	Arg
305					310					315					320
Val	Val	Val	Ser	Lys	Asp	Asp	Thr	Val	Ile	Val	Asp	Gly	Gly	Gly	Thr
				325					330					335	
Ala	Glu	Ala	Val	Ala	Asn	Arg	Ala	Lys	His	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Asp
			340					345					350		
Lys	Ser	Asp	Ser	Asp	Trp	Asp	Arg	Glu	Lys	Leu	Gly	Glu	Arg	Leu	Ala
		355					360					365			
Lys	Leu	Ala	Gly	Gly	Val	Ala	Val	Ile	Lys	Val	Gly	Ala	Ala	Thr	Glu
	370					375					380				
Thr	Ala	Leu	Lys	Glu	Arg	Lys	Glu	Ser	Val	Glu	Asp	Ala	Val	Ala	Ala
385					390					395					400
Ala	Lys	Ala	Ala	Val	Glu	Glu	Gly	Ile	Val	Pro	Gly	Gly	Gly	Ala	Ser
				405					410					415	
Leu	Ile	His	Gln	Ala	Arg	Lys	Ala	Leu	Thr	Glu	Leu	Arg	Ala	Ser	Leu
			420					425					430		
Thr	Gly	Asp	Glu	Val	Leu	Gly	Val	Asp	Val	Phe	Ser	Glu	Ala	Leu	Ala
		435					440					445			
Ala	Pro	Leu	Phe	Trp	Ile	Ala	Ala	Asn	Ala	Gly	Leu	Asp	Gly	Ser	Val
	450					455					460				
Val	Val	Asn	Lys	Val	Ser	Glu	Leu	Pro	Ala	Gly	His	Gly	Leu	Asn	Val
465					470					475					480
Asn	Thr	Leu	Ser	Tyr	Gly	Asp	Leu	Ala	Ala	Asp	Gly	Val	Ile	Asp	Pro
				485					490					495	
Val	Lys	Val	Thr	Arg	Ser	Ala	Val	Leu	Asn	Ala	Ser	Ser	Val	Ala	Arg
			500					505					510		
Met	Val	Leu	Thr	Thr	Glu	Thr	Val	Val	Val	Asp	Lys	Pro	Ala	Lys	Ala
		515					520					525			
Glu Asp His Asp His His His Gly His Ala His															
530 535															

5 <210> 19

<211> 540

<212> PRT

10

<213> Mycobacterium tuberculosis

ES 2 770 438 T3

<400> 19

```

Met Ala Lys Thr Ile Ala Tyr Asp Glu Glu Ala Arg Arg Gly Leu Glu
 1          5          10          15

Arg Gly Leu Asn Ala Leu Ala Asp Ala Val Lys Val Thr Leu Gly Pro
          20          25          30

Lys Gly Arg Asn Val Val Leu Glu Lys Lys Trp Gly Ala Pro Thr Ile
          35          40          45

Thr Asn Asp Gly Val Ser Ile Ala Lys Glu Ile Glu Leu Glu Asp Pro
 50          55          60

Tyr Glu Lys Ile Gly Ala Glu Leu Val Lys Glu Val Ala Lys Lys Thr
65          70          75          80

Asp Asp Val Ala Gly Asp Gly Thr Thr Thr Ala Thr Val Leu Ala Gln
          85          90          95

Ala Leu Val Arg Glu Gly Leu Arg Asn Val Ala Ala Gly Ala Asn Pro
          100          105          110

Leu Gly Leu Lys Arg Gly Ile Glu Lys Ala Val Glu Lys Val Thr Glu
115          120          125

Thr Leu Leu Lys Gly Ala Lys Glu Val Glu Thr Lys Glu Gln Ile Ala
130          135          140

Ala Thr Ala Ala Ile Ser Ala Gly Asp Gln Ser Ile Gly Asp Leu Ile
145          150          155          160

Ala Glu Ala Met Asp Lys Val Gly Asn Glu Gly Val Ile Thr Val Glu
          165          170          175

Glu Ser Asn Thr Phe Gly Leu Gln Leu Glu Leu Thr Glu Gly Met Arg
          180          185          190

Phe Asp Lys Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Phe Val Thr Asp Pro Glu Arg
          195          200          205

```

ES 2 770 438 T3

Gln Glu Ala Val Leu Glu Asp Pro Tyr Ile Leu Leu Val Ser Ser Lys
 210 215 220
 Val Ser Thr Val Lys Asp Leu Leu Pro Leu Leu Glu Lys Val Ile Gly
 225 230 235 240
 Ala Gly Lys Pro Leu Leu Ile Ile Ala Glu Asp Val Glu Gly Glu Ala
 245 250 255
 Leu Ser Thr Leu Val Val Asn Lys Ile Arg Gly Thr Phe Lys Ser Val
 260 265 270
 Ala Val Lys Ala Pro Gly Phe Gly Asp Arg Arg Lys Ala Met Leu Gln
 275 280 285
 Asp Met Ala Ile Leu Thr Gly Gly Gln Val Ile Ser Glu Glu Val Gly
 290 295 300
 Leu Thr Leu Glu Asn Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gly Lys Ala Arg Lys
 305 310 315 320
 Val Val Val Thr Lys Asp Glu Thr Thr Ile Val Glu Gly Ala Gly Asp
 325 330 335
 Thr Asp Ala Ile Ala Gly Arg Val Ala Gln Ile Arg Gln Glu Ile Glu
 340 345 350
 Asn Ser Asp Ser Asp Tyr Asp Arg Glu Lys Leu Gln Glu Arg Leu Ala
 355 360 365
 Lys Leu Ala Gly Gly Val Ala Val Ile Lys Ala Gly Ala Ala Thr Glu
 370 375 380
 Val Glu Leu Lys Glu Arg Lys His Arg Ile Glu Asp Ala Val Arg Asn
 385 390 395 400
 Ala Lys Ala Ala Val Glu Glu Gly Ile Val Ala Gly Gly Gly Val Thr
 405 410 415
 Leu Leu Gln Ala Ala Pro Thr Leu Asp Glu Leu Lys Leu Glu Gly Asp
 420 425 430
 Glu Ala Thr Gly Ala Asn Ile Val Lys Val Ala Leu Glu Ala Pro Leu
 435 440 445
 Lys Gln Ile Ala Phe Asn Ser Gly Leu Glu Pro Gly Val Val Ala Glu
 450 455 460

ES 2 770 438 T3

Lys Val Arg Asn Leu Pro Ala Gly His Gly Leu Asn Ala Gln Thr Gly
465 470 475 480

Val Tyr Glu Asp Leu Leu Ala Ala Gly Val Ala Asp Pro Val Lys Val
485 490 495

Thr Arg Ser Ala Leu Gln Asn Ala Ala Ser Ile Ala Gly Leu Phe Leu
500 505 510

Thr Thr Glu Ala Val Val Ala Asp Lys Pro Glu Lys Glu Lys Ala Ser
515 520 525

Val Pro Gly Gly Gly Asp Met Gly Gly Met Asp Phe
530 535 540

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de péptido aislado o recombinante que consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo:

(i) DGSVVVNKVELPAGH;

(ii) GLNVNTLSYGDLAAD; y

(iii) SELPAGHGLNVNTLS.

2. Una molécula de péptido aislado o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácido DGSVVVNKVELPAGH.

3. Una molécula de péptido aislado o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácido GLNVNTLSYGDLAAD.

4. Una molécula de péptido aislado o recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que consiste en una secuencia de aminoácido SELPAGHGLNVNTLS.

5. Una molécula de ácido nucleico aislado o recombinante que consiste en una secuencia de polinucleótido que codifica un péptido que consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo:

1. DGSVVVNKVELPAGH;

2. GLNVNTLSYGDLAAD; and

3. SELPAGHGLNVNTLS.

6. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina.

7. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso en medicina es la modulación de diapedesis en un sujeto humano.

8. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el uso en medicina es la prevención y/o tratamiento de una condición, enfermedad y/o desorden en un sujeto humano que está asociado con un incremento en el flujo de células sanguíneas blancas a través del endotelio.

9. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 6, en el que el uso en medicina es el tratamiento y/o prevención de condiciones inflamatorias agudas y/o crónicas, preferiblemente el tratamiento y/o prevención de enfermedad pulmonar obstructiva crónica.

10. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la condición inflamatoria está asociada con eosinofilia y/o neutrofilia.

11. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina, de acuerdo con la reivindicación 9 en el que la condición inflamatoria es seleccionada del grupo que consiste en inflamación asociada con infección (tal como choque séptico, sepsis o síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS)), daño por reperusión de isquemia, letalidad por endotoxina, artritis, rechazo hiperagudo mediado por complemento, nefritis, daño de pulmón inducido por citoquina o quimioquina, asma no alérgica, enfermedad inflamatoria del intestino y enfermedad de Crohn.

12. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina, de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el uso en medicina es el tratamiento y/o prevención de desórdenes autoinmunes, preferiblemente en el que el desorden autoinmune es seleccionado del grupo que consiste en anemia hemolítica, trombocitopenia, anemia perniciosa, enfermedad de Addison, diabetes autoinmune, diabetes mellitus dependiente de insulina, miastenia gravis, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, aterosclerosis, encefalitis autoinmune, enfermedad del tejido conectivo, esclerosis múltiple, inflamación pulmonar autoinmune, síndrome de Guillain-Barre, tiroiditis autoinmune, enfermedad de injerto-huésped y enfermedad inflamatoria autoinmune del ojo.

13. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 para uso en medicina de acuerdo con la reivindicación 6 en el que el uso en medicina es el tratamiento y/o prevención de desórdenes alérgicos, preferiblemente en el que el desorden alérgico es seleccionado del grupo que consiste en eczema, dermatitis, rinitis alérgica (fiebre del heno), enfermedades alérgicas de las vías respiratorias, síndrome hipereosinofílico, dermatitis de contacto; enfermedades respiratorias caracterizadas por inflamación eosinofílica de vías respiratorias e hiperrespuesta de las vías respiratorias, tales como asma, incluyendo asma alérgica y asma intrínseca, aspergillosis broncopulmonar alérgica, neumonía eosinofílica, bronquiectasia por bronquitis alérgica, asma ocupacional, síndrome de enfermedad reactiva de vías respiratorias, enfermedad intersticial del pulmón, síndrome hipereosinofílico, enfermedad parasítica del pulmón; anafilaxis, enfermedad del suero, reacciones a los fármacos, alergias alimentarias, alergias al veneno de los insectos, mastocitosis, pneumonitis hipersensible, urticaria, angioedema, eczema, dermatitis atópica, dermatitis de contacto alérgico, eritema multiforme, síndrome de Stevens-Johnson, conjuntivitis alérgica, queratoconjuntivitis atópica, queratoconjuntivitis venérea y conjuntivitis papilar gigante.
14. Una composición farmacéutica que comprende una molécula de péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 y un excipiente farmacéuticamente aceptable.
15. Un sistema adyuvante que comprende (i) una molécula de péptido de acuerdo con la reivindicación 1 y/o una molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 y (ii) un antígeno.

FIGURA 1

La secuencia de nucleótidos y aminoácidos de chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis*.

1	ATGAGCAAGCTGATCGAATACGACGAAACCGCGCGTCCGCGCCATGGAGCTCGGCATGGAC	60
	M S K L I E Y D E T A R R A M E V G M D	
61	AAGCTGGCCGACACCGTSCGGGTGACGCTGGGGCCGCGCGCCGCGCATGTGGTGCTGGCC	120
	K L A D T V R V T L G P R G R H V V L A	
121	AAGGCGTTTGGCGGACCCACGTTACCAACGACGGCGTCACGGTGGCACGTGAGATCGAG	180
	K A F G G P T V T N D G V T V A R E I E	
181	CTGGAAGATCCGTTTGAAGACTTGGGGCGCCAGCTGGTGAAGTGGTGGCCACCAAGACC	240
	L E D P F E D L G A Q L V K S V A T K T	
241	ARCGATGTGGCCGGTGACGGCACCACCACCGCAACCATCTTGGCGCAGGCACTGATCAAG	300
	N D V A G D G T T T A T I L A Q A L I K	
301	GGCGGCCTGAGGCTAGTGGCGCGCGCGCTCAACCGATCGCGCTCGGCGTGGGAATCGGC	360
	G G L R L V A A G V N F I A L G V G I G	
361	AAGGCCGCCGACGCGGTATCCGAGGCGCTGCTGGCATCGGCCACGCCGTGTCCGGCAAG	420
	K A A D A V S E A L L A S A T P V S G K	
421	ACCGGCATCGCGCAGGTGGCGACGGTGTCTCGCGGACGAGCAGATCCGTGACCTGGTT	480
	T G I A Q V A T V S S R D E Q I G D L V	
481	GGCGAAGCGATGAGCAAGTCCGGCCACGACGGCGTGGTCAAGCGTCGAAGAATCCTCGACG	540
	G E A M S K V G H D G V V S V E E S S T	
541	CTGGGCACCGAGTTGGAGTTACCGAGGGTATCGGCTTCGACAAGGGCTTCTTGTCGGCA	600
	L G T E L E F T E G I G F D K G F L S A	
601	TACTTCGTTACCGACTTCGATAACCAGCAGGCGGTGCTCGAGGACGCGTGTATCTGCTG	660
	Y F V T D F D N Q Q A V L E D A I I L L	
661	CACCAAGACAAGATCAGCTCGCTTCCCGATCTGTTGCCATTGCTGGAAAGGTTGCAGGA	720
	H Q D K I S S L P D L L P L L E K V A G	
721	ACGGGTAAAGCCACTACTGATCGTGGCTGAAGACGTGGAGGGCGAAGCGTTGGCGACGCTG	780
	T G K P L L I V A E D V E G E A L A T L	
781	GTCGTCAACGCGATTTCGAAGACGTTGAAGCGGTCCGCGTCAAGGGGCGTACTTCGGT	840
	V V N A I R K T L K A V A V K G F Y F G	
841	GACCGCCGTAAGGCGTTCTTGAGGACCTGGCGGTGGTGACGGGTGGCCAGGTGGTCAAC	900
	D R R K A F L E D L A V V T G G Q V V N	
901	CCCGACGCCGCGCATGGTGTGCGCGAGGTGGGCTTGGAGGTGCTGGGCTCGGCCCGACGC	960
	P D A G M V L R E V G L E V L G S A R R	
961	GTGGTGGTCAGCAAGGACGACACGGTCATTGTGACGGCGGCGGCACCGCAGAAGCGGTG	1020
	V V V S K D D T V I V D G G G T A E A V	
1021	GCCAACCGGGCGAAGCACTTGCGTGCCGAGATCGACAAGAGCGATTTCGGATTGGGATCGG	1080
	A N R A K H L R A E I D K S D S D W D R	
1081	GAAAAGCTTGGCGAGCGCTGGCCAACTGGCCGGCGGGGTTGCTGTCAATCAAGSTGGGT	1140
	E K L G E R L A K L A G G V A V I K V G	
1141	GCCGCCACCGAGACCGCACTCAAGGAGCGCAAGGAAAGCGTCGAGGATGCGGTGCGGCC	1200
	A A T E T A L K E R K E S V E D A V A A	
1201	GCCAAGGCCGCGGTGAGGAGGGCATCGTCCCTGGTGGGGGAGCCTCGCTCATCCACCAG	1260
	A K A A V E E G I V P G G G A S L I H Q	

FIGURA 1 (CONTINUACIÓN)

```

1261  G C C C G C A A G G G C T G A C C G A A C T G C G T G C G T G A C C G G T G A C G A G G T C C T C G G T G T C 1320
      A R K A L T E L R A S L T G D E V L G V

1321  G A C G T G T T C T C C G A A G C C T T G C C G G C C G T T G T T C T G G A T C G C C G C C A A C G C T G G C T T G 1380
      D V F S E A L A A P L F W I A A N A G L

1381  G A C G G C T C G G T G G T G G T C A A C A A G G T C A G C G A G C T A C C G C C G G G C A T G G G C T G A A C G T G 1440
      D G S V V V N K V S E L P A G H G L N V

1441  A A C A C C T G A G C T A T G G T G A C T T G G C C G C T G A C G G C G T C A T C G A C C C G G T C A A G G T G A C T 1500
      N T L S Y G D L A A D G V I D P V K V T

1501  A G G T C G G C G G T G T T G A A C G C G T C A T C G G T T G C C C G G A T G G T A C T C A C C A C G A G A C G G T C 1560
      R S A V L N A S S V A R M V L T T E T V

1561  G T G G T C G A C A A G C C G G C C A A G G C A G A A G A T C A C G A C C A T C A C C A C G G G C A C G C G C A C T G A 1620
      V V D K P A K A E D H D H H H G H A H *

```

FIGURA 2

Péptidos que cubren el dominio ecuatorial (negro) de chaperonina 60.1 de *M. tuberculosis*.

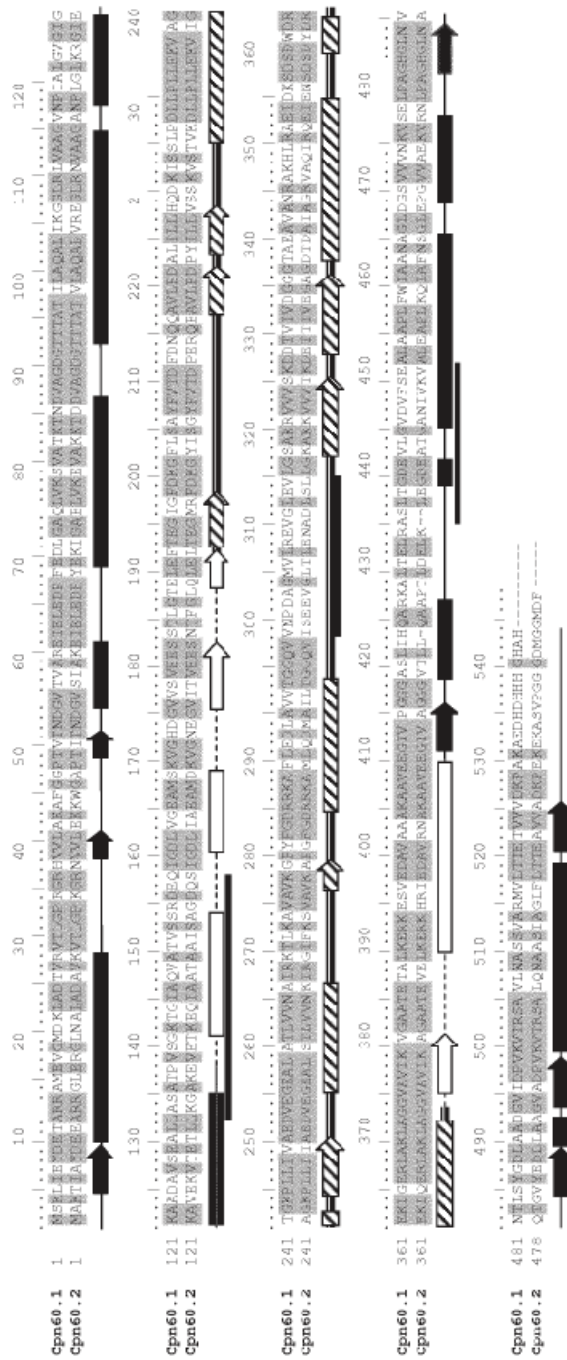


FIGURA 2 (CONTINUACIÓN)

Péptido	Posición en respecto de la proteína de longitud completa (MtCpn60.1)
DGSVVVNKVSELPAGH	461-476
GLNVNTLSYGDLAAD	477-491
SELPAGHGLNVNTLS	470-484
DGSVVVNKVS	461-470
ELPAGHGLNV	471-480
NTLSYGDLAAD	481-491

FIGURA 3

Efecto de fragmentos de péptido F1, F2 y F3 en un modelo de lipopolisacárido (LPS) de inflamación no alérgica

