

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 791 954**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/KR2015/008055**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.12.2016 WO16195159**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15894332 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2020 EP 3305803**

54 Título: **Nuevo antagonista de TLR4**

30 Prioridad:

**29.05.2015 KR 20150076101**

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

**06.11.2020**

73 Titular/es:

**GENESEN CO., LTD. (100.0%)  
3-ho, 9th Floor, 524, Teheran-ro, Gangnam-gu  
Seoul 06181, KR**

72 Inventor/es:

**CHOI, SANG DUN;  
YOO, TAE HYEON y  
PARK, SEOL HEE**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 791 954 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

Nuevo antagonista de TLR4

5 **[Campo técnico]**

La presente divulgación se refiere a un péptido para inhibir una vía de señalización de TLR4, a un antagonista de TLR4 que incluye el péptido y a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias. De manera más específica, la presente divulgación se refiere a un péptido que se une a un compuesto TLR4/MD2 para inhibir la secreción de interleucina 6 (IL-6), NO y ROS, y la activación de NFκB y MAPK, a un antagonista de TLR4 que incluye el péptido y a una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias.

15 **[Antecedentes de la técnica]**

La inmunidad innata es la primera reacción de defensa contra las infecciones bacterianas en un sistema inmunitario de mamíferos, y los receptores de reconocimiento de patrones, tales como los receptores tipo Toll (TLR, de sus siglas en inglés), se activan mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, de sus siglas en inglés) o patrones moleculares asociados a peligros (DAMP, de sus siglas en inglés).

Los TLR desempeñan un papel importante en la respuesta inmunitaria innata y se clasifican en TLR extracelulares que actúan sobre la membrana plasmática, incluyendo TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 y TLR intracelulares que actúan en células tales como lisosomas o endosomas, incluyendo TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. Estructuralmente, los TLR tienen un sitio de repetición rico en leucina (LRR, de sus siglas en inglés) en el extremo N del dominio extracelular que es reconocido por un ligando o una molécula accesoria, y un dominio del receptor Toll/interleucina 1 (TIR, de sus siglas en inglés) que transmite una señal en el extremo C intracelular.

En particular, el receptor 4 tipo Toll (TLR4) es el primer receptor identificado en la familia de TLR, y activa la señalización inmunitaria innata amplificada a través de un proceso de vías de señalización dependientes de MyD88 (diferenciación mieloide 88) y vías de señalización independientes de MyD88. Debido al papel del TLR4, está aumentando el interés en la investigación para utilizar TLR4 como diana para tratar una variedad de enfermedades inmunitarias. El LPS reconocido a través de moléculas accesorias, tales como la proteína de unión a LPS (lipopolisacárido) (LBP, de sus siglas en inglés), CD 14 (grupo de diferenciación 14) y MD2 (factor de diferenciación mieloide 2), activa el TLR4. El TLR4 activado induce la activación temprana de NFκB (factor nuclear potenciador de la cadena ligera kappa de linfocitos B activados), la migración a un núcleo y la activación de MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno) a través de un proceso de vías de señalización dependientes de Myd88. La activación de NFκB y MAPK secreta citocinas inflamatorias tales como TNF-α (factor de necrosis tumoral α), IL-1β (interleucina 1 β) e IL-6 (interleucina 6). Las vías de señalización independientes de MyD88 se inducen mediante la activación de TRAM/TRIF, factores reguladores de interferón (IRF, de sus siglas en inglés) y NFκB para secretar interferones tipo 1. Además, el TLR4 inducido por LPS produce sustancias de estrés oxidativo, tales como monóxido de nitrógeno (en lo sucesivo, denominado NO) y oxígeno activo (en lo sucesivo, denominado ROS) en macrófagos.

Como tal, el TLR4 puede ser una diana para tratar diversas enfermedades tales como enfermedades autoinmunitarias, enfermedades inflamatorias y cáncer, y, por lo tanto, se está estudiando una sustancia dirigida a TLR4 y una composición médica para tratar enfermedades relacionadas con TLR4. En particular, se obtuvo un gran número de promotores y antagonistas de TLR4 mediante la modificación de la estructura esquelética principal del lípido A, y se ha revelado que el eritorán, el lípido A y el lípido A de *Rhodobacter sphaeroids* (RsLA) inhiben la interacción del LPS y el MD2 y previenen el choque inducido por el LPS en ratas.

Por otro lado, los péptidos pequeños capaces de actuar de manera similar u opuesta a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) e interactuar con proteínas diana se encuentran a través de una variedad de técnicas, tales como el ensayo de dos híbridos de levadura y la presentación de fagos, y se realizan estudios de manera activa para estos péptidos en el campo de los adyuvantes terapéuticos y de vacunas. Los péptidos son menos susceptibles a los efectos secundarios que los agentes terapéuticos comunes y se sabe que son susceptibles a la transformación, tal como la eliminación de lípidos o proteínas de las bacterias que activan los TLR.

Sin embargo, existe una creciente necesidad de nuevos antagonistas que puedan bloquear eficazmente la vía de señalización de TLR4 y, por lo tanto, tratar las enfermedades asociadas.

60 **[Divulgación]****[Problema técnico]**

Los presentes inventores confirmaron que los péptidos de SEQ ID NO: 1 a 3 inhiben la vía de señalización de TLR4 inducida por lipopolisacárido (LPS) e inhiben la secreción de interleucina 6 (IL-6), NO y ROS y la activación de NFκB y MAPK, y luego completaron la presente divulgación.

Por consiguiente, un objeto de la presente divulgación es proporcionar un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3, y un nuevo antagonista de TLR4 que incluye el mismo.

5 También es un objeto de la presente divulgación proporcionar una composición para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias que incluye el péptido como principio activo.

10 También es un objeto de la presente divulgación proporcionar una composición para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria que incluye el péptido como principio activo.

**[Solución técnica]**

15 Para lograr el objeto anterior, la presente divulgación proporciona un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.

La presente divulgación también proporciona un antagonista de TLR4 que incluye un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.

20 La presente divulgación también proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias que incluye un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3 como principio activo.

25 La presente divulgación también proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias que comprende un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3 como principio activo.

**[Efectos ventajosos]**

30 El péptido, de acuerdo con la presente divulgación, tiene un excelente efecto de inhibir la secreción de interleucina 6 (IL-6), NO y ROS y la activación de NFκB y MAPK mediante la inhibición de una vía de señalización de TLR4 inducida por un lipopolisacárido (LPS), y, por lo tanto, se puede usar favorablemente como una composición para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que se producen por la vía de señalización de TLR4.

**[Descripción de los dibujos]**

40 La Figura 1 es un gráfico que ilustra la relación salida/entrada de cada ronda de ciclos de selección por afinidad de las bibliotecas de péptidos de 15 mer y 12 mer con el compuesto TLR4/MD2 humano recombinante (1R a 5R en el eje horizontal representa cada ronda de ciclos de selección).

La Figura 2 es un gráfico que ilustra la actividad de la SEAP cuando se tratan con TAP (TAP1, TAP2 y TAP3) o TAP y el LPS a diferentes concentraciones en células HEK-Blue™ hTLR4.

45 La Figura 3 es un gráfico que ilustra la cantidad de IL-6 secretada cuando se trataron con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón, a diferentes concentraciones.

La Figura 4 es un gráfico que ilustra la cantidad de NO secretada cuando se trataron con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón, a diferentes concentraciones.

La Figura 5 es un gráfico que ilustra los resultados de confirmar la cantidad de expresión de iNOS a través de transferencia Western cuando se trataron con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón, a diferentes concentraciones.

50 La Figura 6 es un gráfico que ilustra la cantidad de NO generado en el citoplasma cuando se tratan con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón.

La Figura 7 es un gráfico que ilustra el número de células teñidas con DCF-DA y la cantidad de ROS generada en el citoplasma cuando se tratan con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón.

55 La Figura 8 es un gráfico que ilustra el número de células teñidas con MitoSOX y la cantidad de ROS generado en la mitocondria cuando se tratan con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón.

La Figura 9 es un gráfico que ilustra los resultados de confirmar la actividad de NFκB a través de transferencia Western cuando se tratan con TAP o TAP con el LPS o TAP y PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón.

60 La Figura 10 es un gráfico que ilustra los resultados de confirmar el grado de fosforilación de ERK, JNK y p38 y el nivel de expresión de ATF3 a través de transferencia Western para examinar la actividad de MAPK cuando se tratan con TAP o TAP y el LPS juntos en células RAW264.7, que son macrófagos de ratón.

65 La Figura 11 es un gráfico que ilustra los resultados de confirmar si NFκB se transfiere desde el citoplasma al núcleo cuando se tratan con el LPS o TAP y el LPS juntos en células HEK-Blue™ hTLR4.

La Figura 12 es un gráfico que ilustra esquemáticamente las vías de señalización inducidas por los TAP y el TLR4.

**[Modos de la invención]**

A partir de ahora en el presente documento, se describirá con detalle la presente divulgación.

5 La presente divulgación proporciona un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término "péptido" se refiere a una molécula lineal formada por restos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. El péptido puede prepararse de acuerdo con un método de síntesis química bien conocido en la técnica, y puede prepararse preferentemente de acuerdo con una técnica de síntesis en fase sólida, pero sin limitación a estos.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término "TLR4" se refiere a una proteína que pertenece a los TLR, que es una familia de proteínas transmembrana que funciona como un supervisor para la infección por patógenos, y es una proteína codificada por el gen TLR4, y se denomina CD 284 (grupo de diferenciación 284). El TLR4 es muy importante para la activación del sistema inmunitario innato porque reconoce una variedad de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluido LPS de bacterias gramnegativas.

20 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "vía de señalización de TLR4" se refiere a una vía de señalización a través de TLR4 y puede ser una respuesta LPS que depende del compuesto TLR4/MD2, que es un compuesto transversal de membrana formado por TLR4 y MD2 y, a través de esto, las señales se transmiten. El TLR4 transmite señales por muchas proteínas adaptadoras, y la vía de señalización funciona como Mal (también llamada TIRAP), MyD88 y TRAM y TRIF. El TLR4 activado activa NFκB a través de la vía de señalización dependiente de Myd88 hacia el núcleo e induce la activación de MAPK. Las citocinas inflamatorias, tales como TNF-α, IL-1β e IL-6, se secretan mediante la activación de NFκB y MAPK, y los materiales de estrés oxidativo, tales como el monóxido de nitrógeno (a continuación en el presente documento denominado NO) y el oxígeno activo (a continuación en el presente documento denominado ROS) se generan en macrófagos. Además, la activación de TRAM/TRIF, reguladores de interferón (IRF) y NFκB induce vías de señalización independientes de MyD88 y secreta interferón tipo 1.

35 Tal como se usa en el presente documento, el término "inhibición" se refiere a un fenómeno en el que la vitalidad o la actividad biológica se reducen por deficiencia, incongruencia u otras muchas causas, y la actividad del TLR4 se bloquea, reduce, evita, retrasa, desactiva o disminuye parcial o completamente.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "compuesto TLR4/MD2" se refiere a un compuesto transversal de membrana formado por TLR4 y MD2, y los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1 a 3 de la presente divulgación se unen al compuesto TLR4/MD2, y, por lo tanto, pueden inhibir una vía de señalización de TLR4.

40 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una vía de señalización de TLR4 que inhibe el uso de los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1 a 3.

45 El "uno o más péptidos seleccionados del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3" de la presente divulgación significa un péptido que tiene la misma secuencia que la secuencia de SEQ ID NO: 1 a 3, siempre que tenga la capacidad de unirse de manera eficaz al compuesto TLR4/MD2. Los péptidos pueden incluir un péptido sustituido por una sustitución conservadora de un aminoácido y un péptido que tiene un 70 % o más, preferentemente un 80 % o más, y más preferentemente un 90 % o más de homología de secuencia con el péptido. El término "homología" se refiere a una secuencia de aminoácidos de tipo silvestre y un grado similar a una secuencia de ácido nucleico de tipo silvestre.

50 De acuerdo con una realización de la presente divulgación, los péptidos representados por las SEQ ID NO: 1 a 3 de la presente divulgación inhiben una vía de señalización de TLR4 inducida por lipopolisacárido (LPS), produciendo así un excelente efecto de inhibición de la secreción de interleucina 6 (IL-6), NO y ROS, y la activación de NFκB y MAPK, y, por lo tanto, se pueden usar favorablemente como una composición para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias que ocurren por la vía de señalización de TLR4.

La presente divulgación también proporciona un antagonista de TLR4 que incluye el péptido.

60 Tal como se usa en el presente documento, el término "antagonista" significa una molécula que inhibe parcial o completamente los efectos de otras moléculas tales como receptores o mediadores intracelulares, mediante cualquier mecanismo.

65 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "antagonista de TLR4" se refiere a una sustancia que puede interferir con, reducir o inhibir directa, indirecta o sustancialmente la actividad biológica de TLR4, preferentemente un péptido reactivo con TLR4 se refiere a una sustancia capaz de unirse directamente al TLR4 o al compuesto TLR4/MD2, bloqueando la vía de señalización de TLR4 mediante la neutralización de la actividad del TLR4 e induciendo la

reducción en la activación de NFκB y MAPK, reduciendo así la secreción de citocinas inflamatorias, NO y ROS.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona una composición para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria que incluye el péptido como principio activo.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "enfermedad autoinmunitaria" se refiere a una enfermedad causada por un proceso en el que se produce un problema para inducir o mantener la autotolerancia y se produce una respuesta inmunitaria a un autoantígeno, atacando así el propio tejido. El término "autotolerancia" se refiere a la falta de respuesta inmunitaria que no reacciona de manera nociva a una sustancia antigénica constituida por sí misma. Las enfermedades autoinmunitarias de la presente divulgación incluyen diabetes insulínica, esclerosis múltiple, encefalomielite autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, uveítis experimental, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis, anemia maligna, gastritis atrofica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia precoz, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, uveítis inducida por cataratas, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica Hbs-ve, cirrosis latente, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis/dermatomiositis, LE discoide y lupus eritematoso sistémico, pero no se limita a las mismas.

20 La composición para la prevención o el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias de la presente divulgación puede incluir una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido solo o puede incluir uno o más vehículos, excipientes o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Una cantidad farmacéuticamente eficaz, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad suficiente para prevenir, mejorar y tratar los síntomas de enfermedades autoinmunitarias.

25 La expresión "farmacéuticamente aceptable", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición que es fisiológicamente aceptable y que normalmente no causa una reacción alérgica, tal como trastorno gastrointestinal, mareos o similares, cuando se administra a un ser humano. Los ejemplos del vehículo, excipiente y diluyente incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceite mineral. Puede incluir además rellenos, anticoagulantes, lubricantes, agentes humectantes, perfumes, emulsionantes y conservantes, etc.

35 Además, la composición de la presente divulgación puede incluir uno o más principios activos conocidos que tienen el efecto de tratar una enfermedad autoinmunitaria junto con el péptido.

40 La composición de la presente divulgación puede formularse usando métodos conocidos en la técnica para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del principio activo después de la administración a un mamífero distinto de un ser humano. Las formulaciones pueden encontrarse en forma de polvos, gránulos, comprimidos, emulsiones, jarabes, aerosoles, cápsulas de gelatina blanda o dura, soluciones inyectables estériles, polvos estériles.

45 La composición de la presente divulgación puede administrarse a través de diversas vías, incluyendo oral, transdérmica, subcutánea, intravenosa o muscular, y la dosificación del principio activo puede seleccionarse adecuadamente de acuerdo con diversos factores tales como la vía de administración, la edad, el sexo, el peso y la gravedad de un paciente. La composición para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria, de acuerdo con la presente divulgación, puede administrarse en combinación con un compuesto conocido que tiene el efecto de prevenir, mejorar o tratar síntomas de una enfermedad autoinmunitaria.

50 La presente divulgación también proporciona una composición para prevenir o tratar enfermedades inflamatorias que incluyen el péptido como principio activo.

55 En la presente divulgación, la expresión "enfermedad inflamatoria" se refiere a una enfermedad causada por sustancias inflamatorias (citocinas inflamatorias), tales como TNF-α, IL-1, IL-6, prostaglandina, leucotrienos o NO, secretadas en células inmunitarias, tales como macrófagos, mediante aceleración excesiva del sistema inmunitario debido a estímulos nocivos, tales como un inductor inflamatorio o radiación. Las enfermedades inflamatorias de la presente divulgación incluyen asma, eccema, psoriasis, alergias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, dermatitis de contacto, dermatitis atópica, acné, rinitis atópica, dermatitis alérgica, sinusitis crónica, dermatitis seborreica, gastritis, gota, artritis gotosa, úlceras, bronquitis crónica, inflamación pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, espondilitis anquilosante, sepsis, vasculitis, bursitis, lupus, mialgia reumatoide múltiple, arteritis temporal, esclerosis múltiple, cáncer sólido, enfermedad de Alzheimer, arterioesclerosis, obesidad e infección vírica, pero no se limita a las mismas.

65 Dado que la composición para prevenir o tratar la enfermedad inflamatoria incluye una preparación farmacéutica que incluye el péptido mencionado anteriormente como principio activo, los contenidos que se superponen con la composición de la presente divulgación descrita anteriormente se omiten en la descripción de los contenidos superpuestos a fin de evitar una complejidad excesiva.

La presente divulgación también proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad autoinmunitaria, en el que el método incluye: administrar a un sujeto un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.

5 La presente divulgación también proporciona un método para prevenir o tratar una enfermedad inflamatoria, en el que el método incluye: administrar a un sujeto un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.

10 A partir de ahora en el presente documento, la presente divulgación se describirá más específicamente con referencia a los ejemplos y ejemplos experimentales. Los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales son meramente ilustrativos de la presente divulgación, y el contenido de la presente divulgación no está limitado por los siguientes ejemplos y ejemplos experimentales.

### 15 **Ejemplo 1: Detección de péptidos específicos TLR4/MD2**

Con el fin de detectar péptidos que se unan específicamente al compuesto TLR4/MD2, el péptido de 15 mer construyó fUSE55, y el péptido de 12 mer construyó una biblioteca de presentación de fagos pHEN2, y se realizó un método de presentación de fagos.

#### 20 **Ejemplo 1-1: Preparación de la biblioteca**

Primero, para preparar una biblioteca de péptidos de 15 mer, se utilizaron un cebador directo 5'-TTG ATC GCA AGG ATC GGC TAG C-3' cebador inverso 5'-AA GGC CTT GGT ACC GCT GCC ACC (MNN)<sub>15</sub> GCT AGC CGA TCC TTG  
25 CGA TCA A-3' y ADN polimerasa Pfu (SolGent, Daejeon, Corea) y los procesos de desnaturalización a 90 °C durante 30 segundos, hibridación a 55 °C durante 30 segundos y extensión a 72 °C durante 60 segundos se repitieron 25 veces para amplificar el ADN. Las cadenas de ADN amplificadas se cortaron con *NheII*KpnI y se ligaron en un vector fUSE55 usando ADN ligasa T4 (New England Biolabs, Inc., Ipswich, Massachusetts, EE.UU.). Se transfirieron tres bibliotecas de ADN a las cepas DH10B, que son *E. coli* electrocompetentes, dando como resultado  $6,6 \times 10^7$  clones,  
30 luego se amplificaron y se propagaron en la cepa TG-1 de *E. coli*.

Además, para preparar e insertar una biblioteca aleatoria de péptidos de 12 mer en la región pIII de pHEN2, se utilizaron el cebador directo 5'-GCC CAG CCG GCC ATG GCC (NNK)<sub>12</sub> TCG AGT GGT GGA GGC GGT TCA G-3' cebador inverso 5'-GCC AGC ATT GAC AGG AGG TTG AG-3' y ADN polimerasa Pfu, y los procesos de las  
35 condiciones anteriores se repitieron 25 veces para realizar tres PCR independientes. El producto resultante de PCR se cortó con *NheII*KpnI, se ligó en un vector pHEN2 usando ADN ligasa T4, y los ADN de la biblioteca se introdujeron en cepas XL-1 Blue (Stratagene, Santa Clara, CA, EE.UU.), que son células de *E. coli* electrocompetentes. Las partículas de fago se prepararon para tener una variedad de clones  $2,0 \times 10^9$  usando un hiperfago M13K07Δ pIII (PROGEn Biotechnik GmbH, Heidelberg, Alemania), seguido de amplificación en la cepa XL-1 de *E. coli*.

40 **Ejemplo 1-2: Ciclos de selección** El ciclo de selección se realizó en una biblioteca Griffin-1 modificada (Griffin H., MRC, Cambridge, Reino Unido, datos no publicados). De manera más específica, 5 mg/ml de compuesto TLR4/MD2 (R&D Systems, Inc., Mineápolis, MN, EE.UU.) humano recombinante resuspendido se recubrió con un tampón recubierto en una placa Nunc Maxisorp de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Mass., EE.UU.) y luego  
45 se refrigeró durante la noche. Después, las células se bloquearon con BSA al 1 % en PBS durante 2 horas a temperatura ambiente, y luego los pocillos refrigerados se expusieron a una biblioteca de fagos durante 2 horas a temperatura ambiente para que la concentración de BSA se convirtiera en 1 % en PSB (PBST) incluyendo la concentración final de Tween 20 al 0,05 %. Los fagos unidos a la biblioteca se disolvieron en 100 ml de tampón de elución (HCl 100 mM), se separaron, se lavaron con PBST y se neutralizaron a 1/8 de volumen de Tris HCl 1 M a pH  
50 11. El valor de fago para la biblioteca de 15 mer se calculó en TG1 de *E. coli* sobre una placa de agar LB (Luria-Bertani) que incluye 200 mg/ml de tetraciclina (Tet) y 10 mg/ml de ampicilina (Amp), y el de la biblioteca de 12 mer se calculó como UFC en XL-1 Blue en la placa de agar de *E. coli*. El fago se amplificó luego en TG1, X11 Blue de *E. coli* y se purificó durante rondas posteriores de adsorción a través de precipitación con PEG (polietilenglicol)/NaCl. En cada ronda de un total de 5 rondas, la relación entrada-salida se calculó mediante la medición de la eficacia de  
55 concentración, y los resultados de la misma se ilustran en la Figura 1.

Como se ilustra en la Figura 1, la relación de salida/entrada para el compuesto TLR4/MD2 humano recombinante de la biblioteca de péptidos positivos de 15 mer y 12 mer aumentó aún más a medida que pasa por varias rondas. Por lo tanto, puede entenderse que la eficacia del ciclo de selección de cinco rondas, de acuerdo con la presente divulgación,  
60 es excelente.

#### **Ejemplo 1-3: Detección de fagos que muestra una alta afinidad de unión para el compuesto TLR4/MD2**

Se recogieron clones independientes separados de las células infectadas en los Ejemplos 1-2 anteriores en placas LB/Tet de la biblioteca de 15 mer y en placas de 96 pocillos con fondo en U en la placa de agar LB/Amp de la biblioteca de 12 mer. Después, se alimentó durante la noche a 37 °C después de cinco rondas del ciclo de selección, se colocó

en placas de agar LB/Tet o LB/Amp y se centrifugó a 3000 g durante 30 minutos para obtener una preparación de fago sobrenadante. Para medir la afinidad de unión al fago, el sobrenadante, que se mezcló con el mismo volumen de un tampón de unión que incluye BSA al 2 % en PBS, se añadió a 1,25 mg/ml en una placa de 96 pocillos TLR4/MD2-positivo y en una placa de 96 pocillos TLR4/MD2-negativo. Los pocillos se bloquearon con tampón de bloqueo (PBST que incluye BSA al 2 %) durante 2 horas y luego se lavaron con PBS. Después de la reacción de unión a temperatura ambiente durante 1 hora, el fago no unido se eliminó mediante lavado con PBST. Los fagos combinados se cultivaron con 100 ml de anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP (peroxidasa de rábano picante), los fagos restantes no unidos se lavaron con PBST y se eliminaron para detectar los fagos combinados. Después de eso, se añadieron 100 ml de tetrametilbencidina (Thermo Fisher Scientific Inc.) a cada pocillo, y luego la mezcla se dejó en reposo a temperatura ambiente hasta que apareció el cambio de color, y luego se añadieron 100 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1N para detener la reacción. El fago que muestra una alta afinidad de unión se seleccionó mediante la medición de la absorbancia a 450 nm usando ELISA (BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, EE.UU.) y los fagos seleccionados se usaron en los siguientes experimentos.

### 15 Ejemplo 2: Secuenciación de ADN y síntesis de TAP

Para aislar el ADN del fago del fago seleccionado en el Ejemplo 1-3 anterior, se usó un Kit Miniprep (GeneAll Biotechnology, Seúl, Corea). El ADN de 15 mer utilizó un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos de 5'-TGA ATT TCC TGT ATG AGG-3' y el ADN de 12 mer usó un cebador que tenía una secuencia de nucleótidos de 5'-TTG TGA GCG GAT AAC AATTTG-3' para realizar la secuenciación de ADN con MacroGen (MacroGen Inc., Seúl, Corea). Las secuencias de ADN identificadas mediante la secuenciación se tradujeron en secuencias de aminoácidos y las mutaciones se midieron usando el programa informático BioEdit y se clasificaron. Después, los péptidos (TAP; los péptidos agonistas de TLR4 se denominan genéricamente TAP1, TAP2 y TAP3, a continuación en el presente documento denominados TAP) que tienen la secuencia de aminoácidos ilustrada en la Tabla 1 que tienen alta afinidad de unión a TLR4/MD2, se sintetizaron en PEPTRON (Daejeon, Corea) para tener una pureza del 95 % o superior. TAP1 se disolvió en agua para que la concentración final fuera de 10 mg/ml, y TAP2 y TAP3 se disolvieron en dimetilsulfóxido, y luego se dividieron en partes alícuotas apropiadas a -20 °C para su almacenamiento.

[Tabla 1]

Péptidos que se unen específicamente a TLR4/MD2	
Nombres	Secuencias peptídicas
TAP1 (SEQ ID NO.: 1)	ASANKNLLFKIRYSTAR <u>GGS</u>
TAP2 (SEQ ID NO.: 2)	AMALDCFRWGWRMWC <u>SSG</u>
TAP3 (SEQ ID NO.: 3)	AMAYEIRCWWRW <u>CYTSSG</u>
Las secuencias reveladas mediante ciclos de selección están subrayadas.	

30

### Ejemplo 3: Cultivo y preparación celular

Se añadieron células HEK-Blue™ hTMR4 (InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU.) a DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) (Thermo Fisher Scientific Inc.) al que se añadieron un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Thermo Fisher Scientific Inc.), 50 UI/ml de penicilina, 50 mg/ml de estreptomina (Thermo Fisher Scientific Inc.), 100 mg/ml de normocina (InvivoGen) y una mezcla de antibióticos HEK-Blue (2 ml por 500 ml) (InvivoGen) y se cultivaron en un sistema de cultivo de una condición humidificada de CO<sub>2</sub> al 5 %, 37 °C. Se colocaron células RAW264.7 de macrófagos de ratón (ATCC, Manassas, VA., EE.UU.) en DMEM con bajo contenido de glucosa (Thermo Fisher Scientific Inc.) al que se añadió un 10 % de FBS, 100 UI/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina y se cultivaron en un sistema de cultivo. El LPS se adquirió de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, Missouri, EE.UU.) y PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> se adquirió de Invivogen.

40

### Ejemplo experimental 1: Confirmación de la afinidad de unión de TAP a TLR4/MD2

Con el fin de confirmar la afinidad de unión de TAP (TAP1, TAP2, TAP3) a TLR4/MD2, se midió la actividad de NFκB en células HEK-Blue™ hTLR4 cultivadas en el Ejemplo 3 anterior. El gen indicador de la fosfatasa alcalina embrionaria secretada (SEAP, de sus siglas en inglés) inductiva se localizó debajo de la porción reguladora del promotor mínimo IL-12 p40 (donde IL-12 p40 se produce mediante la activación de NFκB y AP-1 después de la estimulación de TLR4), que incluye un sitio de unión al ADN de NFκB y AP-1 (proteína activadora 1). Después de eso, las células HEK-Blue™ hTLR4 se trataron con concentraciones variables de TAP a 10, 50 y 100 mg/ml, y se calculó el valor promedio de la actividad de la SEAP para medir la actividad del TLR4. Los resultados de los mismos se ilustran en la Figura 2.

50

Como se ilustra en la Figura 2, la actividad de la SEAP no cambió significativamente cuando solo se añadieron los TAP, pero cuando se estimuló el TLR4 con el LPS después del tratamiento con los TAP, la actividad de SEAP inducida por LPS disminuyó de una manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP de

55

la presente divulgación actúan como antagonistas de TLR4/MD2 e inhiben eficazmente la actividad de NFκB inducida por LPS.

### **Ejemplo experimental 2: Efecto de los TAP sobre la secreción de IL-6 y NO y la generación de ROS**

Para confirmar si la secreción de IL-6 (interleucina 6) y NO (óxido nítrico) y la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) en el citoplasma y el núcleo se inhiben cuando los TAP preparados en el Ejemplo 2 anterior se trataron con células RAW264.7 de macrófagos de ratón cultivadas en el Ejemplo 3 anterior, se realizaron los siguientes experimentos.

#### **Ejemplo experimental 2-1: Efecto de los TAP sobre la secreción de IL-6 y NO**

Los valores numéricos de IL-6 y NO del sobrenadante de cultivo de células RAW264.7 del Ejemplo 3 anterior tratado con los TAP preparados en el Ejemplo 2 anterior se midieron usando un kit de ELISA IL-6 de ratón Ready-SET-Go! (eBioscience San Diego, CA, EE.UU.) y kit de detección de NO (iNtRON Biotechnology, Gyeonggi, Corea). Se usó un espectrofotómetro de lector de microplacas (Molecular Devices Inc.) para medir la absorbancia a 450 nm para IL-6 y 540 nm para NO, y los resultados se analizaron usando el programa informático Soft Max Pro 5.3 (Molecular Devices Inc.). Los resultados de los mismos se muestran en las Figuras 3 y 4.

Como se muestra en las Figuras 3 y 4, no hubo cambios significativos en la cantidad de secreción de IL-6 y NO cuando solo se añadieron los TAP, pero se confirmó que cuando se trataron con los TAP y el LPS juntos, la cantidad de secreción de IL-6 y NO disminuyó. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, inhiben la secreción de IL-6 y NO inducida por el LPS.

#### **Ejemplo experimental 2-2: Transferencia Western de iNOS (óxido nítrico sintasa inducible)**

Para realizar la transferencia Western, se mezcló una solución de extracción preproteica (M-PER, Thermo Fisher Scientific Inc.) con la mezcla inhibidora de proteasa y fosfatasa, y se añadió al sedimento celular RAW264.7 del Ejemplo 3 anterior. El sedimento se enfrió durante 10 minutos y luego el lisado se centrifugó a 16000 3 g durante 10 minutos. Después, se usaron los reactivos de extracción nuclear y citoplasmático NE-PER (Thermo Fisher Scientific Inc.) para extraer las proteínas citoplasmáticas y nucleares, respectivamente, y se midió la concentración de la proteína usando un kit BCA (Sigma-Aldrich Co. LLC). Luego se desarrolló la misma cantidad de proteína en gel de SDS-poliacrilamida y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ, EE.UU.). La membrana se bloqueó con leche en polvo desnatada al 0,05 % en agua desionizada durante 1 hora y se inmunotransfirió con el anticuerpo primario mediante agitación suave durante la noche a una temperatura de 4 °C (el anticuerpo primario era el anticuerpo para iNOS (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU.) y β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE.UU.). Luego, la membrana se agitó completamente con PBST y luego la membrana se cultivó con anticuerpo secundario conjugado con HRP antirratón/conejo (Thermo Fisher Scientific Inc.) durante 2 horas, y la proteína se detectó con solución ECL SuperSignal West Pico (Thermo Fisher Scientific Inc.) y se visualizó con un sistema Fuji LAS-3000 (Fujifilm, Tokio, Japón). Los resultados de los mismos se ilustran en la Figura 5.

Como se ilustra en la Figura 5, cuando se añadió el LPS, la expresión de iNOS aumentó en comparación con el grupo de control de β-actina. Sin embargo, cuando se trataron junto con los TAP, la expresión de iNOS disminuyó de manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, inhiben la expresión de iNOS inducida por el LPS.

#### **Ejemplo experimental 2-3: Efecto de los TAP sobre la generación de NO y ROS**

Para confirmar el efecto de los TAP preparados en el Ejemplo 2 anterior sobre la generación de NO y ROS (especies reactivas de oxígeno) en el citoplasma, las células RAW264.7, que son los macrófagos de ratón cultivados en el Ejemplo 3 anterior, se trataron con los TAP. Cada uno de ellos se tiñe con DAF-FM (Invitrogen Corp., CA, EE.UU.), DCF-DA (Invitrogen Corp.) y MitoSOX (Invitrogen Corp.), y luego se cultiva durante 1 hora. Después, la centrifugación se realizó a 200 3 g durante 5 minutos, se recogió y se transfirió a un tubo marrón, y se almacenó a una temperatura de 4 °C en PBS. El NO se cuantificó con tinción DAF-FM, las ROS citoplasmáticas se cuantificaron con tinción DCF-DA y las ROS de mitocondrias se cuantificaron con tinción MitoSOX. La intensidad de los materiales fluorescentes DAF-FM, DCF-DA y MitoSOX se midió utilizando FACSaria III como programa informático de Diva, y se realizó la cuantificación. Las imágenes se obtuvieron usando el programa informático WinMDI, y sus resultados se ilustran en las Figuras 6 a 8.

Como se ilustra en las Figuras 6 a 8, cuando se añadió el LPS, aumentó el grado de generación de NO y ROS en el citoplasma y ROS en el núcleo. Sin embargo, cuando se trataron junto con los TAP, el grado de generación de NO y ROS disminuyó de manera dependiente de la concentración. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, inhiben la generación de NO y ROS inducida por el LPS en el citoplasma y el núcleo.

#### **Ejemplo experimental 3: Efecto de los TAP sobre la actividad de NFκB y MAPK**

El siguiente experimento se realizó para confirmar el efecto de los TAP preparados en el Ejemplo 2 anterior sobre la actividad de NFκB y MAPK.

### 5 Ejemplo experimental 3-1: Transferencia Western de NFκB y MAPK

Se realizó una transferencia Western de la misma manera que en el Ejemplo Experimental 2-2 para confirmar el efecto de los TAP preparados en el Ejemplo 2 anterior sobre la actividad de NFκB y MAPK. Los anticuerpos primarios utilizados fueron los anticuerpos para HDAC1 (Merck Millipore, Billerica, MA, EE.UU.), NFκB (p65), IκBα, p-ERK, ERK, p-JNK, JNK, p-p38, p38, ATF3 y β-actina (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EE.UU.) y el anticuerpo secundario fue un anticuerpo secundario conjugado con HRP antirrata/conejo (Thermo Fisher Scientific Inc.). Los resultados obtenidos mediante la realización de la transferencia Western se ilustran en las Figuras 9 y 10.

Como se ilustra en la Figura 9, cuando solo se trató con LPS en células RAW264.7 de macrófagos de ratón, que es un grupo de control, la actividad de NFκB aumentó y se degradó IκBα, pero cuando se trataron junto con los TAP, la actividad de NFκB se inhibió y el grado de degradación de IκBα disminuyó. En particular, cuando PAM<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub>, que es un ligando de TLR1/2, se trató con los TAP, no hubo efecto sobre la actividad de NFκB y el grado de degradación de IκBα. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, se unen específicamente a TLR4 e inhiben la actividad de NFκB inducida por el LPS.

Además, como se ilustra en la Figura 10, cuando solo se trató con LPS en células RAW264.7 de macrófagos de ratón, que es un grupo de control, la actividad de MAPK aumentó, ERK, JNK y p38 se fosforilaron, y aumentó la expresión de ATF3, pero cuando se trataron junto con los TAP, la actividad de MAPK se inhibió, disminuyó el grado de fosforilación de las enzimas y también disminuyó la cantidad de expresión de ATF3. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, inhiben la actividad de MAPK inducida por LPS y la expresión de ATF3.

### Ejemplo experimental 3-2: Confirmación del movimiento del NFκB al núcleo

Las células HEK-Blue™ hTLR4 cultivadas en el Ejemplo 3 anterior se sembraron en una placa de 96 pocillos a 10<sup>4</sup>/pocillo y se cultivaron en una incubadora durante 2 días. Después de intercambiar el sobrenadante, las células en la incubadora se trataron con cada TAP y después de 1 hora, se trataron con 20 mg/ml de LPS, respectivamente. Las células HEK-Blue™ hTLR4 se fijaron luego con formaldehído al 3,7 % durante 10 minutos, se sumergieron en Triton X-100 al 0,2 % durante 15 minutos y luego se bloquearon con FBS al 5,0 % durante 1 hora. Las células bloqueadas se cultivaron con anticuerpo primario durante 1 hora y luego se cultivaron con anticuerpo secundario conjugado con AlexaFluor 546 (Invitrogen Corp.) durante 1 hora. Después de eso, se utilizaron 5 mM de Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich Co.) para filtrar a temperatura ambiente durante 30 minutos, y se usó un microscopio confocal (LSM-700, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Alemania) para contar el número de las células teñidas con fluorescencia. Las imágenes se analizaron usando el programa informático Zen 2009 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH). Los resultados de los mismos se ilustran en la Figura 11.

Como se ilustra en la Figura 11, cuando solo se trató con el LPS, el NFκB se distribuyó uniformemente en el citoplasma y el núcleo, pero cuando se trataron junto con los TAP, el NFκB solo estaba presente en el citoplasma. Por lo tanto, puede entenderse que los TAP, de acuerdo con la presente divulgación, inhiben el movimiento del NFκB inducido por LPS al núcleo e inhiben la expresión de factores inflamatorios expresados por NFκB y la expresión de iNOS y ATF3.

### [Aplicabilidad industrial]

El péptido de la presente divulgación tiene un excelente efecto de inhibición de la secreción de interleucina 6 (IL-6), NO y ROS, y la activación de NFκB y MAPK mediante la inhibición de una vía de señalización TLR4, y, por lo tanto, puede actuar como antagonista de TLR4, y se puede usar favorablemente como una composición para prevenir o tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades inflamatorias asociadas con el TLR4.

<110> AJOU UNIVERSITY INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> nuevo antagonista de TLR4

<130> AJOU1\_15\_PCT

<150> KR 10-2015-0076101

<151> 29-05-2015

<160>3

<170> KopatentIn 2.0

ES 2 791 954 T3

<210> 1  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
5  
<220>  
<223> TAP1  
10  
<400> 1  
Ala Ser Ala Asn Lys Asn Leu Leu Phe Lys Ile Arg Tyr Ser Thr Ala  
1 5 10 15  
Arg Gly Gly Ser  
20  
<210> 2  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
15  
<220>  
<223> TAP2  
20  
<400> 2  
Ala Met Ala Leu Asp Cys Phe Arg Trp Gly Trp Arg Met Trp Cys Ser  
1 5 10 15  
Ser Gly  
25  
<210> 3  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
30  
<220>  
<223> TAP3  
<400> 3  
Ala Met Ala Tyr Glu Ile Arg Cys Trp Trp Arg Trp Cys Tyr Thr Ser  
1 5 10 15  
35 Ser Gly

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.
2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido es para inhibir una vía de señalización de TLR4 (receptor 4 tipo Toll).
3. El péptido de la reivindicación 2, en donde la vía de señalización de TLR4 se induce mediante LPS (lipopolisacárido).
4. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido inhibe interleucina 6 (IL-6), NO o ROS (especies reactivas de oxígeno).
5. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido inhibe la actividad de NFκB o MAPK.
6. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido se une a un compuesto TLR4/MD2.
7. Un antagonista de TLR4 (receptor 4 tipo Toll), que comprende un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3.
8. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria, comprendiendo la composición un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3 como principio activo.
9. La composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria de la reivindicación 8, en donde la enfermedad autoinmunitaria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en diabetes insulino dependiente, esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria experimental, artritis reumatoide, artritis autoinmunitaria experimental, miastenia grave, tiroiditis, uveítis experimental, tiroiditis de Hashimoto, mixedema primario, tirotoxicosis, anemia maligna, gastritis atrófica autoinmunitaria, enfermedad de Addison, menopausia precoz, infertilidad masculina, diabetes juvenil, síndrome de Goodpasture, pénfigo vulgar, penfigoide, oftalmia del simpático, uveítis inducida por cataratas, anemia hemolítica autoinmunitaria, leucopenia idiopática, cirrosis biliar primaria, hepatitis activa crónica Hbs-ve, cirrosis latente, colitis ulcerosa, síndrome de Sjogren, esclerodermia, granulomatosis de Wegener, polimiositis/dermatomiositis, LE discoide y lupus eritematoso sistémico.
10. Una composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, comprendiendo la composición un péptido representado por una o más secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 a 3 como principio activo.
11. La composición para su uso en la prevención o el tratamiento de una enfermedad inflamatoria de la reivindicación 10, en donde la enfermedad inflamatoria es al menos una seleccionada del grupo que consiste en asma, eccema, psoriasis, alergias, artritis reumatoide, artritis psoriásica, dermatitis atópica, acné, rinitis atópica, inflamación pulmonar, dermatitis alérgica, sinusitis crónica, dermatitis de contacto, dermatitis seborreica, gastritis, gota, artritis gotosa, úlceras, bronquitis crónica, inflamación pulmonar, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, espondilitis anquilosante, sepsis, vasculitis, bursitis, lupus, mialgia reumatoide múltiple, arteritis temporal, esclerosis múltiple, cáncer sólido, enfermedad de Alzheimer, arterioesclerosis, obesidad e infección vírica.

FIG.1

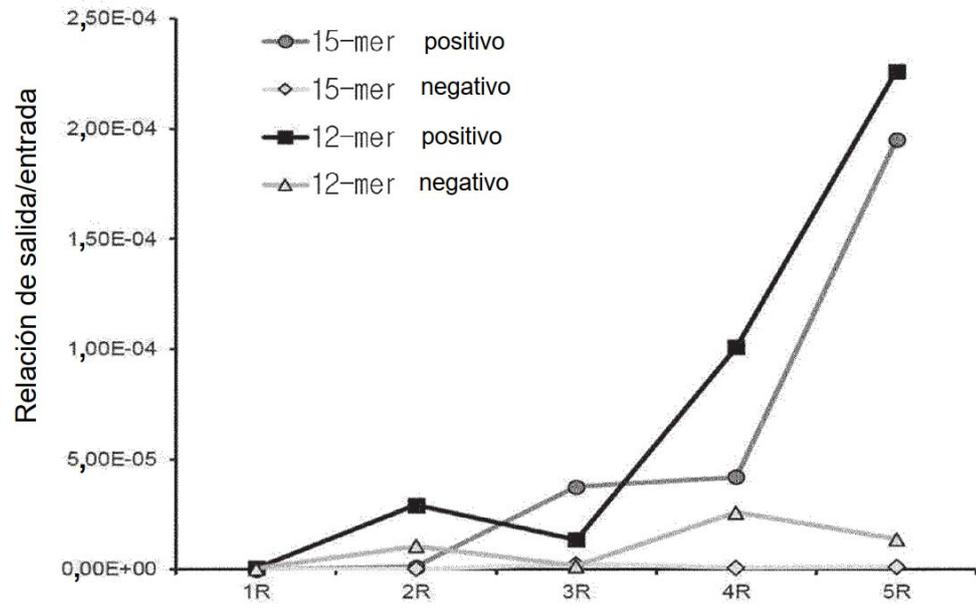


FIG.2

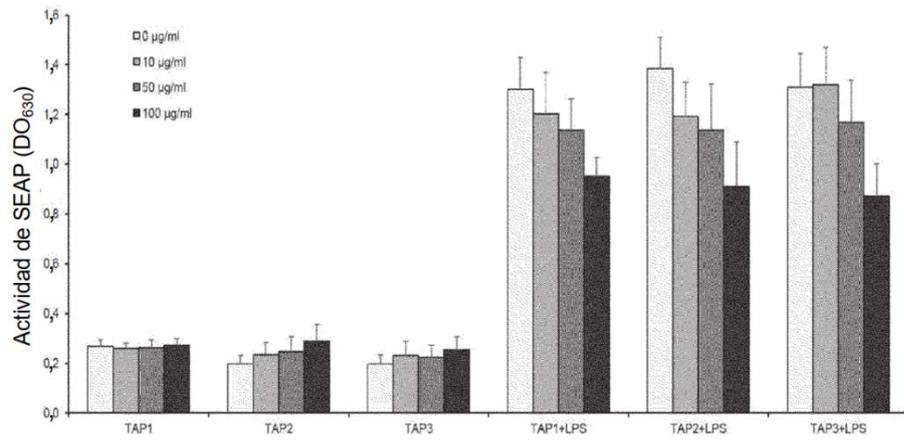


FIG.3

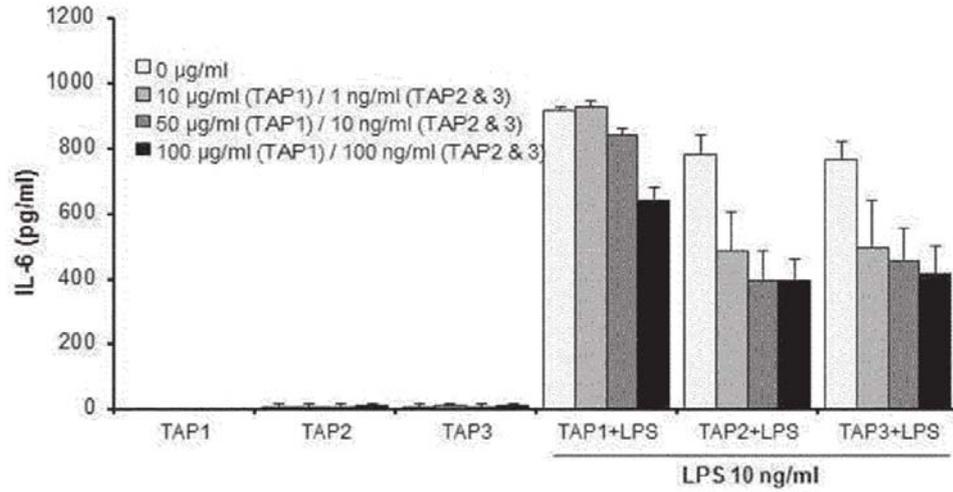


FIG.4

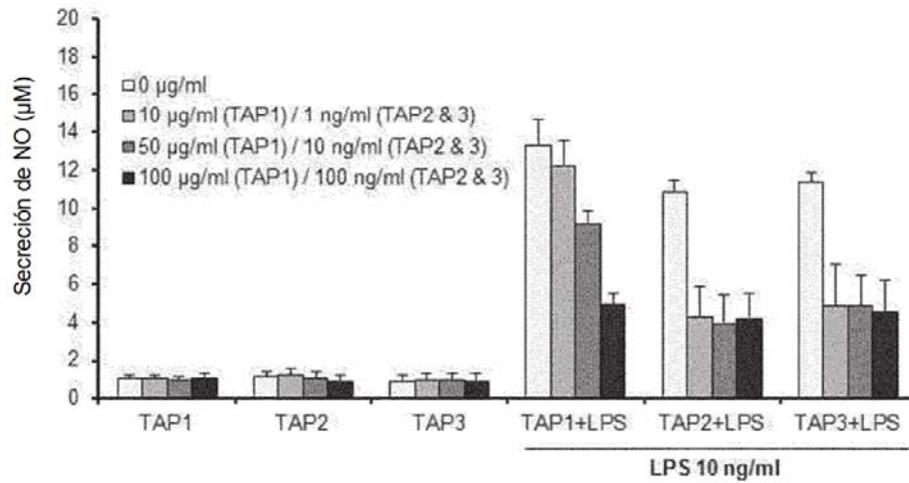


FIG.5

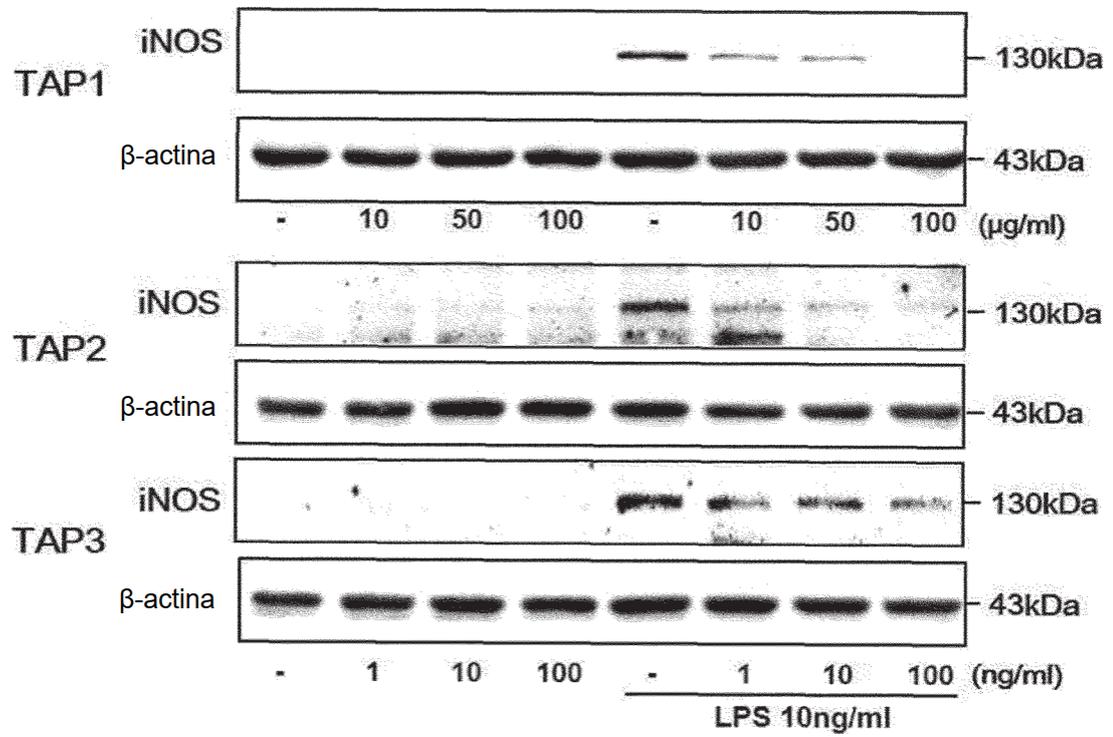


FIG.6

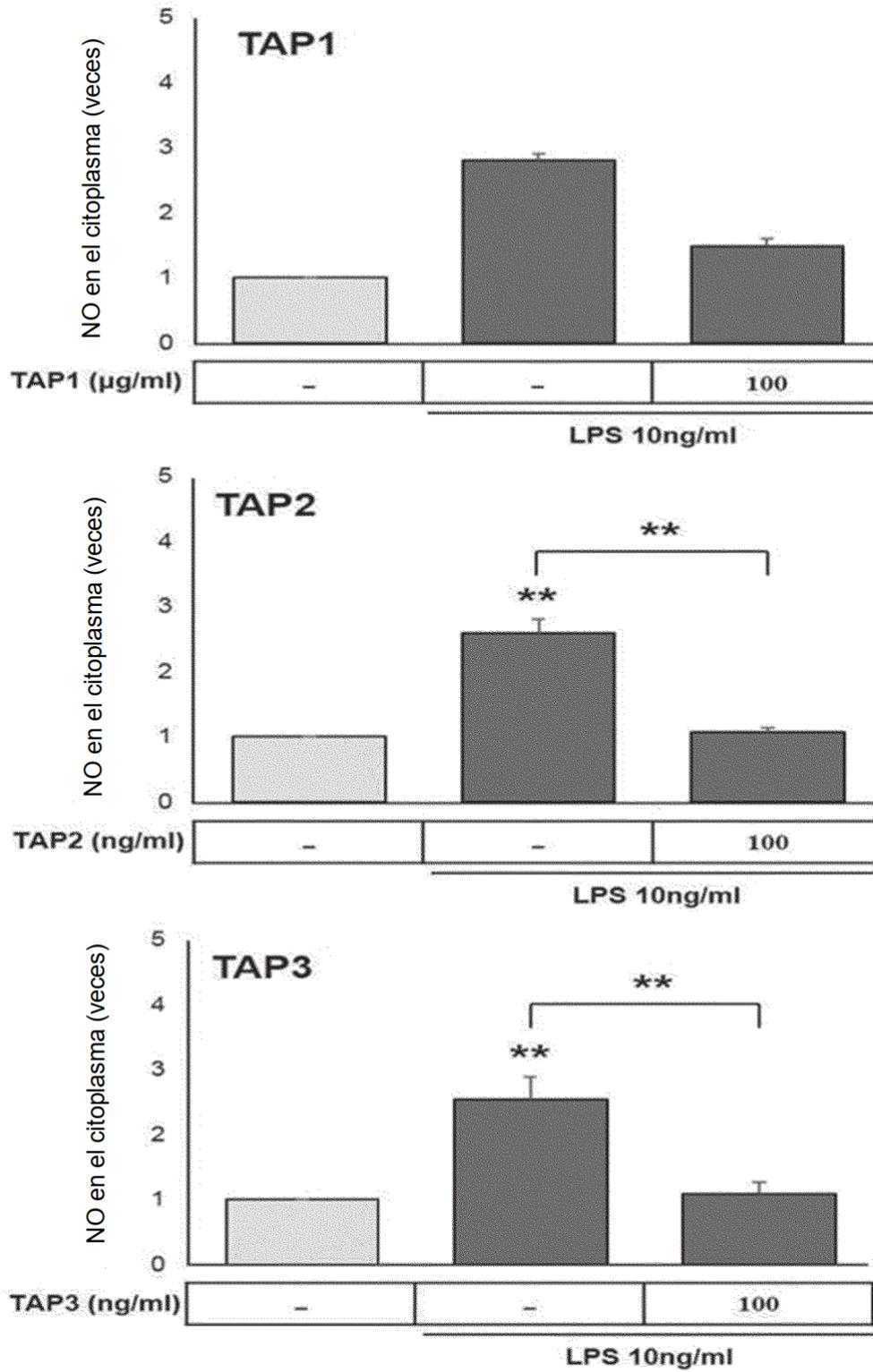


FIG.7

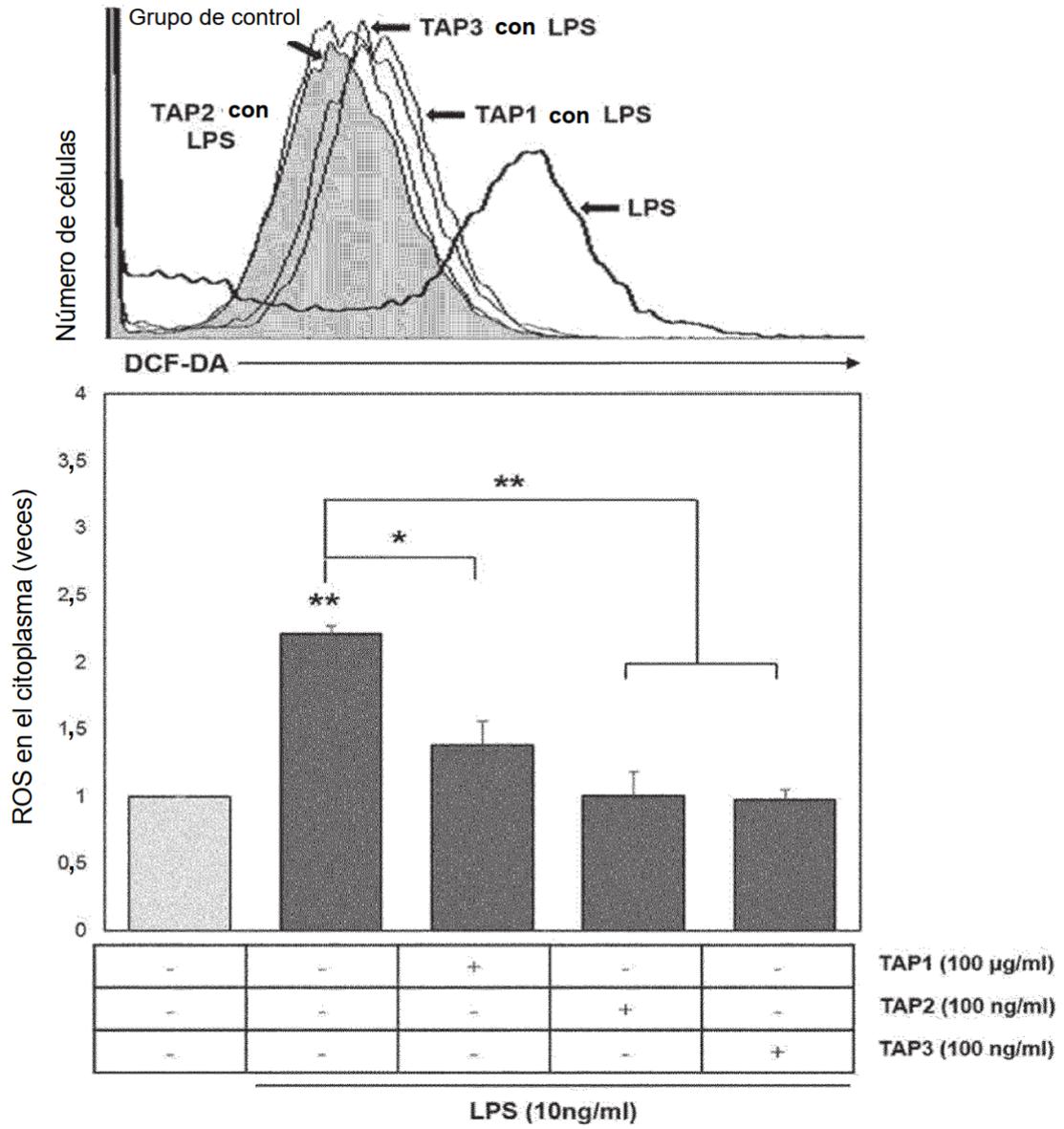


FIG.8

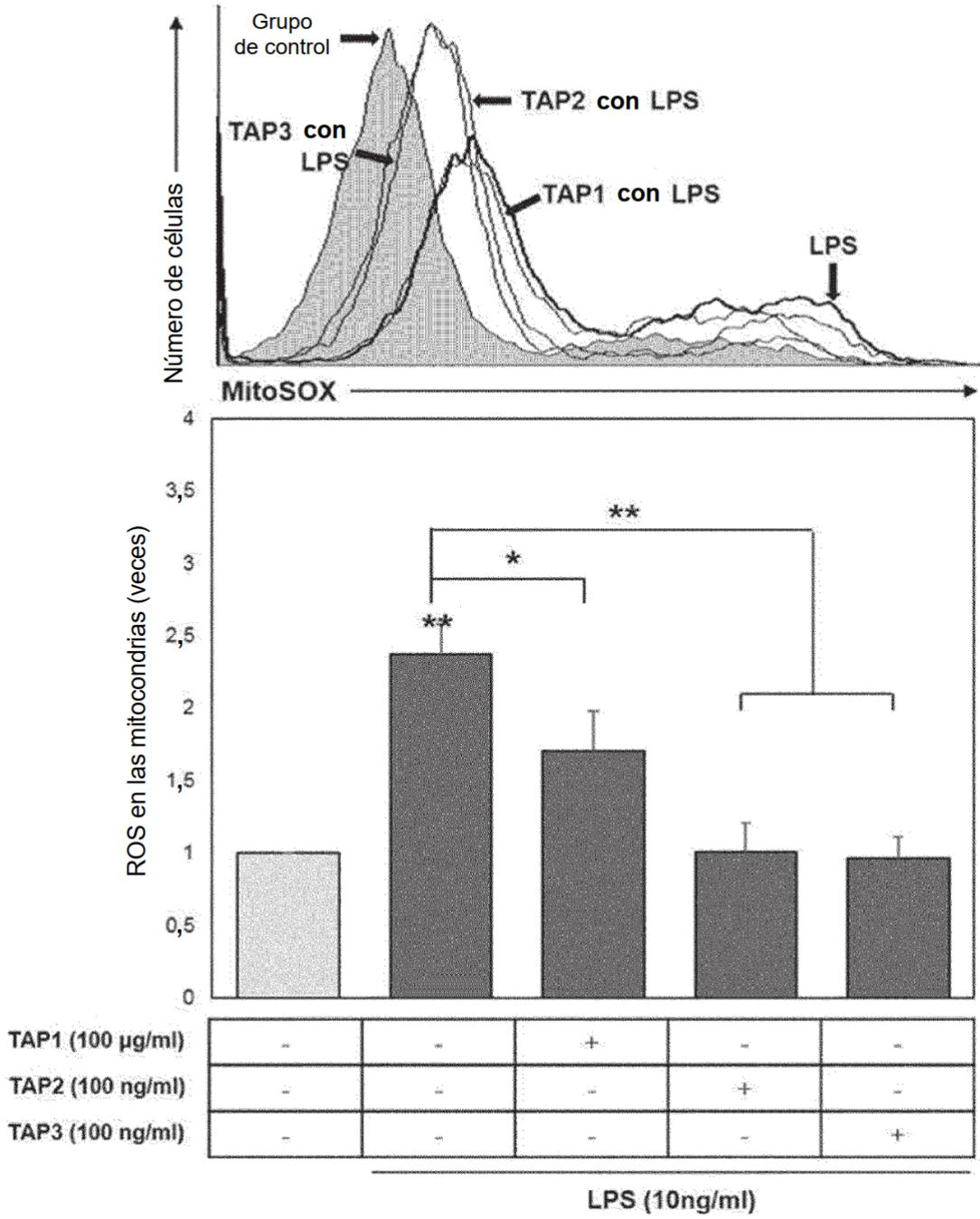


FIG.9

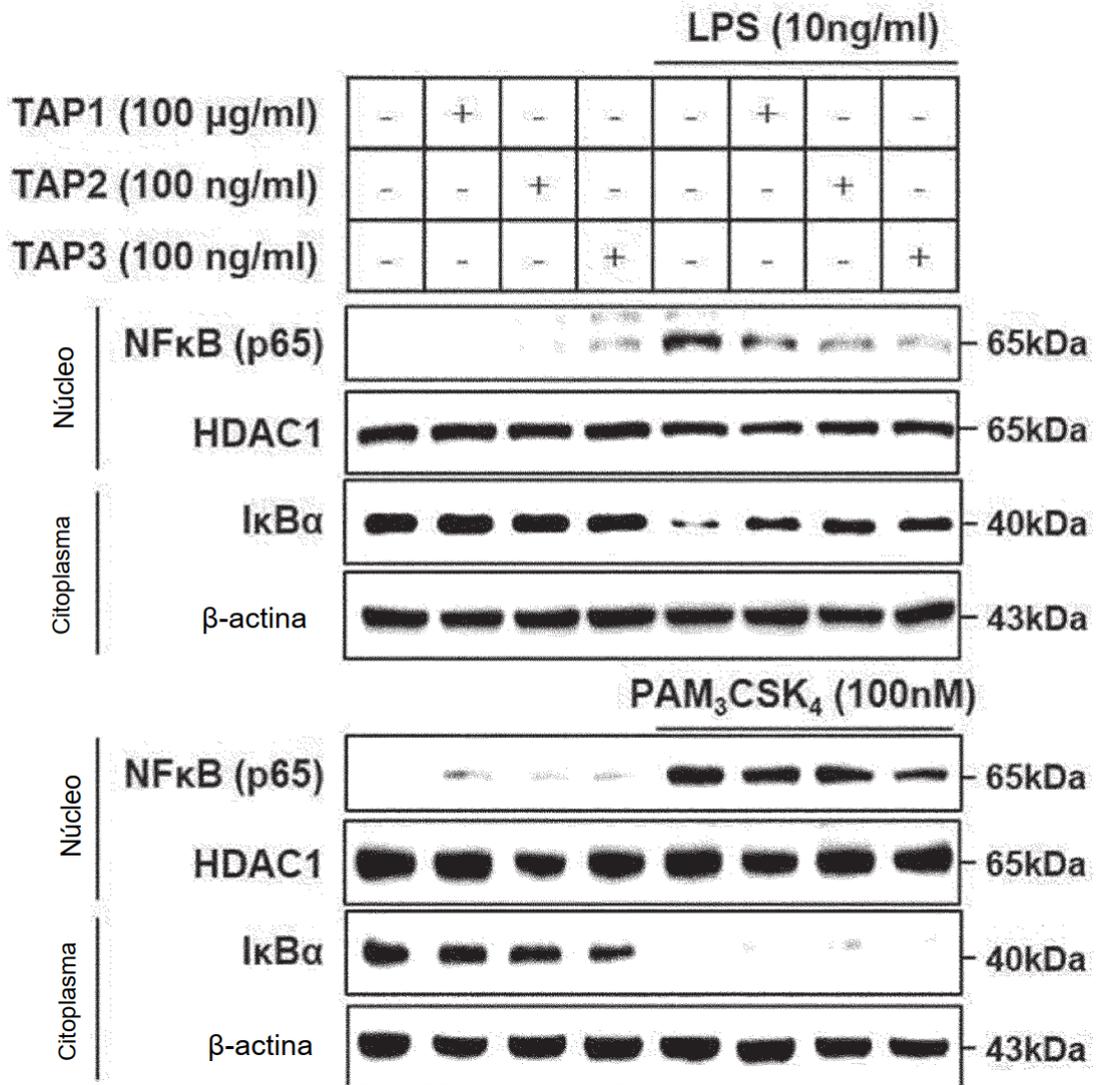


FIG.10

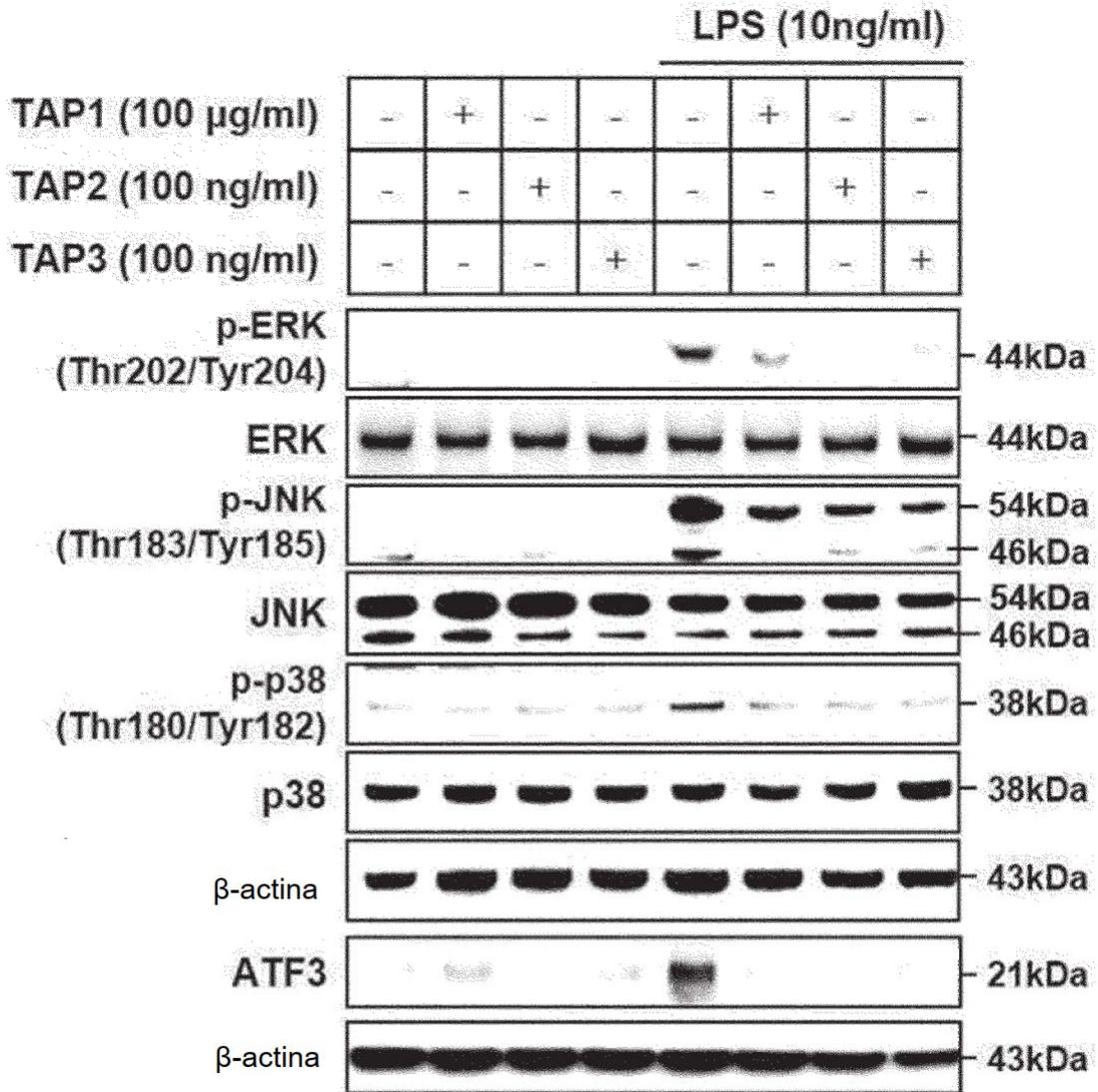


FIG.11

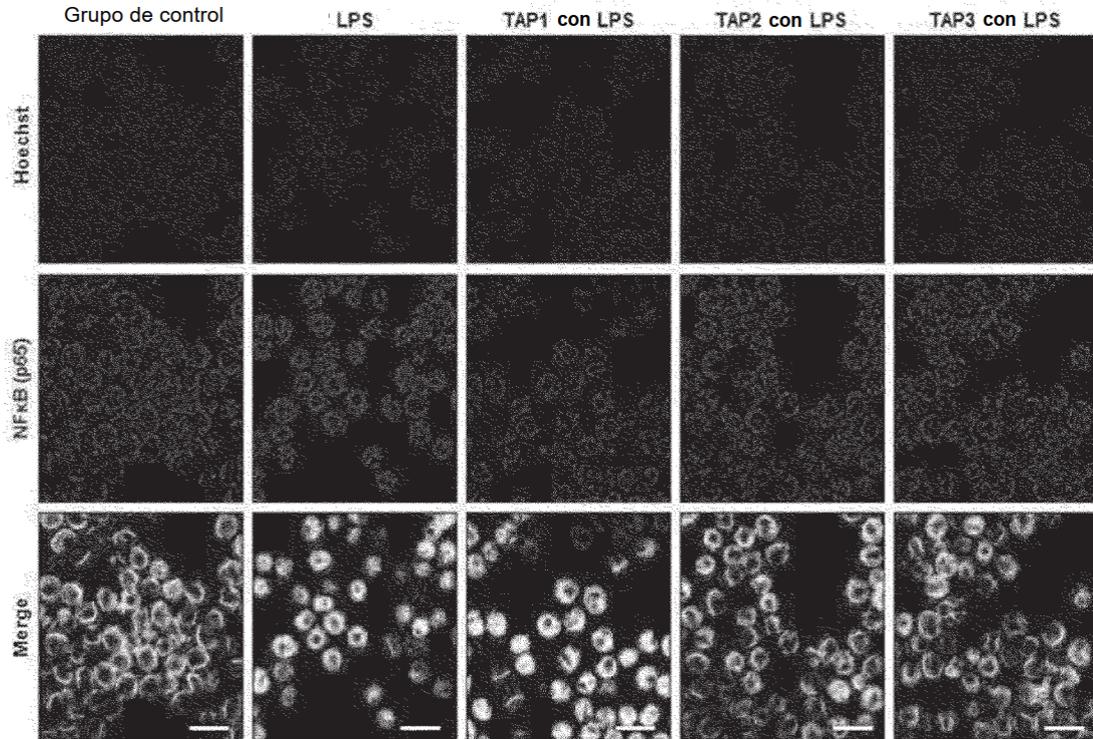


FIG.12

