

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 823 235**

51 Int. Cl.:

C07K 5/10 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

A61K 38/07 (2006.01)

A61K 38/08 (2009.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2017 PCT/KR2017/003446**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.10.2017 WO17179838**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2017 E 17782593 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2020 EP 3444263**

54 Título: **Péptido que tiene actividad antiinflamatoria, y uso del mismo**

30 Prioridad:

15.04.2016 KR 20160046089

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

06.05.2021

73 Titular/es:

**CAREGEN CO., LTD. (100.0%)
46-38 LS-ro 91beon-gil, Dongan-gu
Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, KR**

72 Inventor/es:

**CHUNG, YONG JI y
KIM, EUN MI**

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 823 235 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

Péptido que tiene actividad antiinflamatoria, y uso del mismo

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antiinflamatoria y un uso del mismo.

10 Antecedentes de la técnica

15 Las respuestas inflamatorias son una serie de respuestas fisiológicas compuestas, tales como activación enzimática, secreción de mediadores inflamatorios, infiltración de fluidos corporales, migración celular y destrucción tisular, y síntomas externos, tales como eritema, edema, fiebre y dolor, que se presentan en asociación con varios mediadores inflamatorios y células inmunitarias en vasos sanguíneos tópicos y fluidos corporales, cuando los tejidos o células están dañados o infectados con fuentes de infección externas (por ejemplo, bacterias, hongos, virus, varios tipos de alérgenos).

20 Específicamente, cuando las bacterias extrañas invaden un tejido específico y proliferan, los leucocitos en el organismo vivo reconocen tal condición y atacan activamente a las bacterias extrañas proliferantes. Los leucocitos muertos generados durante el proceso se acumulan en el tejido invadido por las bacterias, mientras que los restos celulares de las bacterias invasoras muertas por los leucocitos experimentan lisis en el tejido, dando como resultado la formación de abscesos.

25 En el caso de una respuesta inflamatoria normal, actúan para eliminar las fuentes de infección extrañas y regenerar el tejido dañado para restablecer las funciones de los organismos vivos. Sin embargo, cuando los antígenos no se eliminan o las respuestas inflamatorias se producen de forma excesiva o continua debido a sustancias intrínsecas, tales respuestas inflamatorias producen inflamación aguda como enfermedades potencialmente mortales, enfermedades de las articulaciones tales como artritis reumatoide, enfermedades cutáneas tales como psoriasis o similares, y enfermedades alérgicas inflamatorias tales como asma bronquial, y también actúan como obstáculos en procesos de tratamiento, tales como transfusión de sangre, administración de fármacos y trasplante de órganos.

30 El factor α de necrosis tumoral (TNF- α) es una citoquina producida por macrófagos y varias células, que se activan en las respuestas inmunitarias del hospedador para infecciones bacterianas y enfermedades tumorales. Esta citoquina también se ha conocido como un medio importante en las respuestas inflamatorias, y es una citoquina inflamatoria que desempeña un papel fundamental en enfermedades inflamatorias, tales como artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica, enfermedad de Crohn, psoriasis y espondilitis anquilosante (AS).

35 Por ejemplo, el TNF- α mantiene la inflamación sinovial y destruye continuamente huesos y cartílagos en la artritis reumatoide. Por lo tanto, se requiere la inhibición de la actividad biológica específica del TNF- α , y por lo tanto se han desarrollado varias preparaciones biológicas para inhibir el TNF- α con el fin de prevenir la respuesta celular mediada por el TNF- α y ajustar las actividades de las citoquinas proinflamatorias y los procedimientos regulados por el TNF- α .

40 Como medicamentos actuales para la inflamación se encuentran la dexametasona y la cortisona que usan componentes hormonales adrenocorticales. Sin embargo, estos actúan como medicamentos para la inflamación, pero tienen una fuerte toxicidad y a menudo producen síntomas tal como edema, como efectos secundarios de los mismos. En algunos casos, es posible que estos medicamentos no actúen de forma selectiva sobre las causas de la inflamación, produciendo una supresión inmunitaria grave [Check W. A. y Kaliner M. A., Am. Rev. Respir. Dis., 141, p44-51. 1990].

45 Los fármacos esteroideos que usan hormonas adrenocorticales, que son agentes antiinflamatorios disponibles en la actualidad, también presentan efectos secundarios graves, tal como edema, y, por lo tanto, es urgente desarrollar medicamentos no esteroideos que no tengan efectos secundarios.

55 Descripción detallada de la invención**Problema técnico**

60 Los presentes inventores se esforzaron en desarrollar péptidos excelentes que tuvieran actividad biológicamente eficaz. Como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido compuesto por una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 tiene actividad antiinflamatoria, y por lo tanto completaron la presente invención.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención es proporcionar un péptido que tenga actividad antiinflamatoria.

65 Otro aspecto de la presente invención es proporcionar una composición antiinflamatoria.

Solución técnica

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona un péptido que tiene actividad antiinflamatoria que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

5 Los presentes inventores se esforzaron en desarrollar péptidos excelentes que tuvieran actividad biológicamente eficaz. Como resultado, los presentes inventores establecieron que un péptido compuesto por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 tiene actividad antiinflamatoria.

10 El péptido de la presente invención puede incluir una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, y puede estar compuesto por una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

15 La endotoxina bacteriana, lipopolisacárido (LPS), estimula la producción de factores de inflamación, tales como iNOS, COX-2, TNF- α , ROS intracelulares y varias interleuquinas en macrófagos (Hinz, B., Brune, K. Cyclooxygenase-2-10 years later. *J Pharmacol Exp Ther* 300(2):367-375, 2002; y Anti-oxidative and anti-inflammatory effect of fractionated extracts of *Draconis Resina* in macrophages, *The Korean Journal of Herbology*, 23(2):179-192, 2008). Por lo tanto, se considera que las sustancias para inhibir los factores de inflamación producidos por LPS se pueden usar favorablemente en el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias implicadas en la actividad de los macrófagos.

20 De acuerdo con la presente invención, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias, inhibe la expresión del factor COX-2 relacionado con la inflamación, reduce la producción de ROS, y suprime la activación de los linfocitos T, suprimiendo por último de ese modo las respuestas inflamatorias.

25 De acuerdo con una realización de la presente invención, el péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 de la presente invención inhibe la expresión de las citoquinas inflamatorias TNF- α , IL-2, IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-15, IL-18, GM-CSF, e IFN- α . Más preferentemente, el péptido de la presente invención inhibe la expresión de TNF- α , IL-2, e IFN- γ .

30 De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención inhibe la expresión de COX-2, que es una enzima que desempeña un papel importante en la regulación de las respuestas inflamatorias, al estimular la biosíntesis de prostaglandinas. La COX-2 rara vez se expresa en condiciones normales, pero se expresa rápidamente mediante estimulaciones mitogénicas, tales como factores de inflamación o citoquinas, endotoxinas o genes oncogénicos.

35 De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención reduce la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), que es un factor importante en las respuestas inflamatorias. Mitocondrias y enzimas, como peroxisoma, xantina oxidasa (XOD), NADPH oxidasa y COX, que están presentes en las células, producen continuamente ROS, y las especies reactivas del nitrógeno (RNS) se producen en grandes cantidades debido a las respuestas inmunitarias de macrófagos, neutrófilos y otras células inmunitarias en el momento de las respuestas inmunitarias, y aquí también se producen ROS (Delanty, N., Dichter, M. A. Oxidative injury in the nervous system. *ActaNeuroScand* 98: 145-153, 1998; y Brune, B., Zhou, J., Von Knethen, A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis. *Kidney Int Suppl* 84: 22-24, 2003).

40 Las respuestas inflamatorias corresponden a una serie de mecanismos de activación para potenciar los sistemas de restauración in vivo y reducir el daño de los mismos, y las respuestas inflamatorias están reguladas por mecanismos muy complicados. Es importante que las respuestas inflamatorias sostenidas por el daño o la regeneración tisulares repetidos produzcan grandes cantidades de ROS y RNS en las células relacionadas con la inflamación, dando como resultado una degeneración genética permanente, produciendo afecciones patológicas (Kaplanski, G., *et al.*, IL-6: a regulator of the transition from neutrophil to monocyte recruitment during inflammation. *Trends Immunol* 24(1):25-29,2003.). Como tal, ROS y RNS están estrechamente relacionadas con las respuestas inflamatorias.

45 De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención suprime la activación de los linfocitos T. El péptido de la presente invención inhibe la expresión de CD3 y CD25, que son marcadores de expresión de la activación de los linfocitos T, en células en las que las respuestas de inflamación están inducidas por LPS.

50 De acuerdo con otra realización de la presente invención, el péptido de la presente invención suprime la proliferación de células inflamatorias.

55 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 de la presente invención se puede preparar mediante métodos de síntesis química conocidos, especialmente, técnicas de síntesis en fase sólida (solid-phase synthesis techniques; Merrifield, J. *Amer. Chem. Soc.* 85:2149-54 (1963); y Stewart, *et al.*, *Solid Phase Peptide*

Synthesis, 2ª ed., Pierce Chem. Co.: Rockford, 111 (1984)) o técnicas de síntesis en fase líquida (documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.516.891). De acuerdo con una realización de la presente invención, un grupo protector, que se selecciona entre el grupo que consiste en un grupo acetilo, un grupo fluorenil metoxi carbonilo, un grupo formilo, un grupo palmitoilo, un grupo miristilo, un grupo estearilo, y polietilenglicol (PEG), se puede unir a los extremos N o C terminales del péptido.

La modificación de aminoácido mencionada anteriormente tiene como objeto mejorar de forma significativa la estabilidad del péptido de la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "estabilidad" se refiere a la estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, estabilidad durante el almacenamiento a temperatura ambiente) así como a la estabilidad *in vivo*. El grupo protector mencionado anteriormente actúa para proteger al péptido de la presente invención del ataque por enzimas de escisión de proteínas *in vivo*.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición antiinflamatoria que contiene, como principio activo, al menos un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en péptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

Dado que la composición antiinflamatoria contiene, como principio activo, el péptido mencionado anteriormente que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, las descripciones de los contenidos superpuestos entre ellos se omiten para evitar una complejidad excesiva de la presente memoria descriptiva.

El péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 es muy eficaz en la prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias al inhibir la expresión de citoquinas inflamatorias y al suprimir la proliferación de células inflamatorias.

La enfermedad inflamatoria, a la que se puede aplicar la composición antiinflamatoria de la presente invención, incluye dermatitis atópica, encefalitis, enteritis inflamatoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, choque hemorrágico pulmonar, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, enfermedades inflamatorias crónicas por infecciones virales o bacterianas crónicas, colitis, enteropatía inflamatoria, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, artritis reactiva, osteoartritis, psoriasis, esclerodermia, osteoporosis, aterosclerosis, miocarditis, endocarditis, pericarditis, fibrosis quística, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, lepra, sífilis, enfermedad de Lyme, borreliosis, borreliosis neurogénica, tuberculosis, sarcoidosis, lupus, lupus discoide, lupus de sabañones, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, degeneración macular, uveítis, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjogren, fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria, encefalomielitis miálgica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson y esclerosis múltiple, pero no se limita a las mismas.

La composición para prevención o tratamiento de la enfermedad inflamatoria se puede preparar en una composición farmacéutica.

Cuando la composición de la presente invención se prepara en una composición farmacéutica, la composición de la presente invención puede contener: (a) una cantidad farmacéuticamente eficaz del péptido de la presente invención mencionado anteriormente; y (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable, pero no se limita a los mismos.

Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad suficiente para alcanzar la eficacia o actividad del péptido mencionado anteriormente.

El vehículo farmacéuticamente aceptable contenido en la composición farmacéutica de la presente invención se usa normalmente en el momento de la formulación, y ejemplos del mismo pueden incluir, pero no se limitan a, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidón, goma arábica, fosfato de calcio, alginato, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua, jarabe, metilcelulosa, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y/o aceite mineral. La composición farmacéutica de la presente invención puede contener además un lubricante, un agente humectante, un agente edulcorante, un agente saborizante, un emulsionante, un agente de suspensión, un conservante, y similares, además de los ingredientes mencionados anteriormente.

Los vehículos y agentes farmacéuticamente aceptables adecuados se describen en detalle en Remington's Pharmaceutical Sciences (19ª ed., 1995).

La composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar por vía oral o por vía parenteral, preferentemente por vía parenteral, y ejemplos de la administración parenteral pueden incluir inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, administración tópica, y administración transdérmica.

Una dosis adecuada de la composición farmacéutica de la presente invención puede variar en función de diversos factores, tales como el método de formulación, la forma de administración, la edad, peso corporal, sexo y morbilidad

del paciente, dieta, el momento de la administración, la tasa de excreción y sensibilidad de respuesta. Mientras tanto, la dosis de la composición farmacéutica de la presente invención es de 0,0001-200 μg al día.

5 La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una forma farmacéutica unitaria o en un envase de múltiples dosis usando un vehículo y/o excipiente farmacéuticamente aceptable de acuerdo con el método fácilmente realizado por una persona con conocimientos habituales en la materia a la que pertenece la presente invención.

10 En el presente documento, la forma farmacéutica puede ser una solución en un medio oleoso o acuoso, una suspensión, una emulsión, un extracto, un polvo, gránulos, un comprimido, una cápsula, o un gel (por ejemplo, un hidrogel), y puede incluir además un dispersante o un estabilizante.

Efectos ventajosos

15 La presente invención se dirige a un péptido que tiene actividad antiinflamatoria y que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. El péptido inhibe la expresión de citoquinas inflamatorias y suprime la proliferación de células inflamatorias, mostrando finalmente actividad antiinflamatoria, y por lo tanto se puede usar de manera favorable en la prevención o tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Breve descripción de los dibujos

20 La Figura 1a muestra los resultados de RT-PCR que confirman los cambios de expresión de TNF- α e IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

25 La Figura 1b es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de TNF- α por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

30 La Figura 1c es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 1d muestra los resultados de RT-PCR que confirman los cambios de expresión de TNF- α e IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

35 La Figura 1e es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de TNF- α por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 1f es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

40 La Figura 1g muestra los resultados de RT-PCR que confirman los cambios de expresión de TNF- α e IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

45 La Figura 1h es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de TNF- α por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 1i es un gráfico de los resultados de RT-PCR que confirman el cambio de expresión de IL-2 por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

50 La Figura 2a muestra los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 2b es un gráfico de los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

55 La Figura 2c muestra los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

60 La Figura 2d es un gráfico de los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 2e muestra los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

65 La Figura 2f es un gráfico de los resultados de la transferencia de Western que confirman el cambio de expresión de COX2 por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3a muestra los resultados de ELISA que confirman los cambios de secreción de TNF- α e INF- γ en esplenocitos por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3b muestra los resultados de ELISA que confirman el cambio de secreción de TNF- α en macrófagos por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3c muestra los resultados de ELISA que confirman los cambios de secreción de TNF- α e INF- γ en esplenocitos por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3d muestra los resultados de ELISA que confirman el cambio de secreción de TNF- α en macrófagos por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 3e muestra los resultados de ELISA que confirman el cambio de secreción de TNF- α en macrófagos por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4a muestra los resultados de la medición de la reducción de la producción de ROS por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4b muestra los resultados del ensayo de proliferación por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4c muestra los resultados de la medición de la reducción de la producción de ROS por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4d muestra los resultados del ensayo de proliferación por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4e muestra los resultados de la medición de la reducción de la producción de ROS por un péptido compuesto por las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 4f muestra los resultados del ensayo de proliferación por un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5a muestra los resultados del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5b es un gráfico del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5c muestra los resultados del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5d es un gráfico del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5e muestra los resultados del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

La Figura 5f es un gráfico del análisis de FACS de CD3+ y CD25+ cuando los esplenocitos se trataron con un péptido compuesto por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 de acuerdo con una realización de la presente invención.

Mejor modo para realizar la invención

La presente invención se refiere a un péptido que tiene actividad antiinflamatoria y que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Modo para realizar la invención

En lo sucesivo en el presente documento, la presente invención se describirá en detalle con referencia a ejemplos. Estos ejemplos son solo para ilustrar la presente invención más específicamente, y para los expertos en la materia será evidente que el ámbito de la presente invención no está limitado por estos ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo de síntesis 1: síntesis peptídica

700 mg de resina de cloruro de clorotritilo (resina CTL, N.º de cat. 01-64-0021 de Nova Biochem) se colocaron en un recipiente de reacción, y se añadieron 10 ml de cloruro de metileno (MC), seguido de agitación durante 3 minutos.

- 5 Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y a continuación el disolvente se retiró de nuevo. Después de colocar 10 ml de una solución de diclorometano en el reactor, y añadir 200 mmoles de Fmoc-Asp(OtBu)-OH (Bachem, Suiza) y 400 mmoles de diisopropiletilamina (DIEA) a esto, la mezcla se disolvió bien con agitación, seguido de reacción con agitación durante 1 hora. Después de la reacción, se realizó el lavado, y a continuación metanol y DIEA (2:1) se disolvieron en diclorometano (DCM) para llevar a cabo la reacción durante 10 minutos, seguido de lavado con exceso de DCM/DMF (1:1).
- 10 Después de retirar la solución, se añadieron 10 ml de dimetilformamida (DMF), seguido de agitación durante 3 minutos, y a continuación el disolvente se retiró de nuevo. 10 ml de una solución de desprotección (piperidina al 20 %/DMF) se colocaron en el recipiente de reacción, seguido de agitación a temperatura ambiente durante 10 minutos, y a continuación la solución se retiró.
- 15 Se añadió una cantidad igual de una solución de desprotección, y a continuación la reacción se mantuvo de nuevo durante 10 minutos, y a partir de ese momento, la solución se retiró, seguido de lavado dos veces con DMF, una vez con MC, y una vez con DMF, durante 3 minutos cada uno, preparando de ese modo la resina Asp(OtBu)-CTL.
- 20 10 ml de una solución de DMF se colocaron en un reactor nuevo, y se añadieron 200 mmoles de Fmoc-Arg(Pbf)-OH (Bachem, Suiza), 200 mmoles de HoBt, y 200 mmoles de Bop, y la mezcla se disolvió bien con agitación.
- 25 Después de añadir 400 mmoles de DIEA al reactor en dos porciones divididas, la agitación se realizó durante al menos 5 minutos hasta que todos los sólidos se disolvieron. La solución mixta de aminoácidos disueltos se añadió al recipiente de reacción que contenía la resina desprotegida en el mismo, y la reacción se realizó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de retirar el líquido de reacción, la agitación se realizó usando una solución de DMF tres veces durante 5 minutos cada una, seguido de retirada. Una pequeña cantidad de la resina de reacción se extrajo para comprobar el alcance de la reacción usando el ensayo de Kaiser (ensayo de ninhidrina).
- 30 La reacción de desprotección se realizó dos veces usando una solución de desprotección de la misma manera que se describió anteriormente, preparando de ese modo la resina Arg(Pbf)-Asp(OtBu)-CTL. Después de lavar suficientemente con DMF y MC, el ensayo de Kaiser se realizó de nuevo, y a continuación se realizó el siguiente ensayo de unión de aminoácido de la misma manera que se describió anteriormente.
- 35 Una reacción en cadena se realizó en el orden de Fmoc-Met-OH y Fmoc-Thr(tBu)-OH de acuerdo con la secuencia de aminoácidos seleccionada. El grupo protector Fmoc se retiró por reacción dos veces con la solución de desprotección durante 10 minutos para cada uno y a continuación se lavó bien. A continuación se añadieron anhídrido acético, DIEA, y HoBt para realizar la acetilación durante 1 hora, la resina de peptidilo preparada se lavó con DMF, MC, y metanol tres veces cada uno, se secó bajo flujo lento de gas nitrógeno, y se secó completamente mediante descompresión a vacío en P2O5. A partir de ese momento, se añadieron 30 ml de una solución de salida [ácido trifluoroacético al 95 % (TFA), agua destilada al 2,5 %, y tioanisol 2,5 %], y la reacción se mantuvo durante 40 2 horas mientras que la mezcla se agitaba intermitentemente a temperatura ambiente. La resina se obtuvo mediante filtración, se lavó con una cantidad pequeña de una solución de TFA, y a continuación se mezcló con la solución de reserva.
- 45 Después de realizar la destilación a presión reducida para reducir el volumen total a la mitad, se añadieron 50 ml de éter frío para inducir la precipitación, y a continuación los precipitados se recogieron por centrifugación, seguido de lavado dos veces con éter frío.
- 50 La solución de reserva se retiró, seguido de secado suficiente en atmósfera de nitrógeno, sintetizando de ese modo 0,8 g de un péptido que incluía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 antes de su purificación (rendimiento: 90,1 %).
- 55 Usando un sistema de análisis de peso molecular se determinó que el peso molecular del mismo era 521,6 (valor teórico: 521,5).
- Con el método descrito anteriormente se sintetizó un péptido que consistía en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 2.

[Tabla 1]

SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos	Valor del análisis (Espectrómetro de masas)	
		Valor analítico	Valor teórico
1	Thr-Met-Arg-Asp	521,6	521,5
2	Asp-Asn-Cys-Leu-Arg	619,7	619,6

3	Gly-Val-Gln-His-Gln-Ala-Ser-Pro-Tyr	986,0	986,0
---	-------------------------------------	-------	-------

Ejemplo 1: RT-PCR para TNF- α e IL-2

- 5 Después de sacrificar ratones de 6-7 semanas de edad para obtener el bazo, el bazo se trituró usando un filtro celular, y se centrifugó con medio RPMI 1640 sin suero. La fase superior se descartó, y para la retirada de los glóbulos rojos (RBC), se usó tampón para lisis de RBC.
- 10 Los RBC se retiraron dos veces, seguido de lavado por medio RPM11640 suero, y a continuación se añadió una cantidad apropiada de medio RPM11640 sin suero.
- Se hizo el recuento de las células, y se sembraron en placa de 96 pocillos (1×10^6 células/pocillo) y placa de 24 pocillos (1×10^7 células/placa). Al día siguiente, las células se trataron con las respectivas muestras peptídicas (0,2, 2, 20 ug/ml) y el LPS estimulador. Aquí, el experimento se realizó ajustando el punto temporal.
- 15 El ARN total se extrajo usando Easy Blue (Intron). Para la síntesis del ADN monocatenario a partir de ARN, se usó mezcla previa para RT (Intron), y a ésto se añadieron 3 ug de ARN, 2 ug de hexámero aleatorio, y agua tratada con DEPC para alcanzar un volumen total de 20 ul, seguido de reacción durante 5 minutos a 65 °C y 1 hora a 42 °C. El calentamiento se realizó de nuevo a 95 °C durante 5 minutos para preparar ADNc.
- 20 La PCR se realizó mezclando 3 ul de ADNc y 10 pmoles de cebadores específicos para el gen CGI 58 con mezcla previa para PCR (Intron). Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C durante 30 segundos, 55-56 °C durante 30 segundos, y 72 °C durante 30 segundos. Los genes se analizaron en las condiciones en las que los resultados de la PCR se podrían amplificar exponencialmente. Se obtuvieron 5 ul de producto de PCR, se sometió a electroforesis sobre gel de agarosa al 1 %, y la tinción se realizó con bromuro de etidio. Los resultados se muestran en las
- 25 Figuras 1a a 1i.

[Tabla 2]

SEQ ID NO	Nombre del cebador	Secuencia (5'-3')
4	TNF- α Directo	CGTCAGCCGATTRTGCTATCT
5	TNF- α Inverso	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG
6	IL-2 Directo	CTCGCTTCCTGTGTACATT
7	IL-2 Inverso	ATCCTGGGGAGTTTCAGGTT

- 30 Como se puede confirmar a partir de las Figuras 1a a 1i, se observó que la expresión de TNF- α e IL-2 presenta una tendencia a disminuir en el tratamiento con el péptido que incluía la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 2: Transferencia de Western

- 35 Los esplenocitos obtenidos en el ejemplo 1 se sembraron en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 1×10^7 células/pocillo. A continuación, después de incubación durante la noche, las células se trataron con los péptidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 con concentraciones diferentes (0,2-20 ug/ml), seguido de incubación en una incubadora a 37 °C durante 24 horas, y a continuación las células se trataron con tampón de lisis celular para
- 40 asegurar el lisado, seguido de cuantificación de proteínas. A continuación, se realizó la transferencia de Western con respecto al factor inductor de inflamación COX2, y los resultados se muestran en las Figuras 2a a 2f.

- Como se puede confirmar a partir de las Figuras 2a a 2f, la expresión de COX2 se redujo cuando se trató con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 3: ELISA

3-1: ELISA (esplenocitos)

- 50 Los esplenocitos tratados con las muestras peptídicas y el LPS estimulador en el ejemplo 1 se incubaron durante 48 horas, y a continuación los medios de cultivo se recogieron. Los medios obtenidos se sometieron a un experimento usando un kit de ELISA (R&D system) para citoquinas (TNF- α e INF- γ) que se van a investigar.

3-2: ELISA (células Raw264.7)

- 55 Las células Raw264.7 se sembraron a 1×10^6 células/48 pocillos, y se incubaron durante la noche. Las células se

trataron previamente con las muestras que se van a investigar a 0,2, 2, y 20 ug/ml, y después de 30 minutos, las células se trataron con LPS. La incubación se realizó en el momento programado. Después de 24 horas, los medios de cultivo se recogieron, y los medios obtenidos se sometieron a un experimento usando un kit de ELISA (R&D system) para la citoquina (TNF- α) que se va a investigar.

5 Como se puede confirmar a partir de las Figuras 3a a 3d, la secreción de TNF- α e INF- γ disminuyó en los esplenocitos y la secreción de TNF- α presentaba una tendencia a disminuir en las células RAW264.7 en el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

10 Como se puede confirmar también a partir de la Figura 3e, la secreción de TNF- α disminuyó en las células RAW264.7 en el tratamiento con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3.

Ejemplo 4: Ensayo de proliferación y FACS

15 4-1. Ensayo de proliferación (esplenocitos)

Como se ha descrito en el ejemplo 1, el experimento se realizó usando el kit Ez-cytox 24 horas después del tratamiento con la muestra peptídica y el LPS estimulador.

20 4-2. FACS [Ensayo de ROS intracelular (DCF-DA)]

25 Las células Raw264.7 se sembraron a 1×10^6 células/6 pocillos, y se incubaron durante la noche. Las células se trataron previamente con las muestras que se van a investigar a 1, 10, y 50 ug/ml, y después de 30 minutos, las células se trataron con LPS. Las células se incubaron de acuerdo con el momento programado, y a continuación 30 minutos después del tratamiento con DCF-DH, la actividad de oxidación se midió mediante el grado de fluorescencia usando FACS. Los resultados se muestran en las Figuras 4a a 4f.

30 Como se puede confirmar a partir de las Figuras 4a a 4f, la producción de ROS se redujo cuando se trató con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3. La viabilidad de los esplenocitos se redujo cuando se trató con los péptidos en el ensayo de proliferación.

Ejemplo 5: Análisis de activación de linfocitos T (sistema FACS)

35 Las células se trataron con las muestras peptídicas y el LPS estimulador como se describió en el ejemplo 1, y después de 24 horas, las células se trataron con marcadores de activación de linfocitos T con anticuerpos (CD3 y CD25) durante 30 minutos, seguido de lavado dos veces con PBS, y a continuación se realizó la FACS. Los resultados se muestran en las Figuras 5a a 5f.

40 Como se puede confirmar a partir de las Figuras 5a a 5f, las células CD3+ y CD25+ disminuyeron cuando se trataron con el péptido que incluye la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, o SEQ ID NO: 3.

Aplicabilidad industrial

45 La presente invención se refiere a un péptido que actividad antiinflamatoria y a un uso del mismo.

<110> CAREGENCO., LTD.

<120> Péptidos que tienen actividades para antiinflamación y usos de los mismos

50 <130> PP170019

<160> 7

55 <170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Péptido 1

60

<400> 1

Thr Met Arg Asp

1

<210> 2

<211> 5
 <212> PRT
 <213> Péptido 2
 5 <400> 2

Asp Asn Cys Leu Arg
1 5

 <210> 3
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Péptido 3

 <400> 3

Gly Val Gln His Gln Ala Ser Pro Tyr
1 5

 <210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Cebador directo de TNF-alfa
 20 <400> 4
 cgtcagccga ttrtgctatc t 21

 <210> 5
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de TNF-alfa
 30 <400> 5
 cggactccgc aaagtctaag 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador directo de IL-2
 35 <400> 6
 ctcgcttct gtgtcacatt 20

 <210> 7
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Cebador inverso de IL-2
 40 <400> 7
 atcctgggga gtttcaggtt 20

 <110> CAREGENCO., LTD.
 50 <120> Péptidos que tienen actividades para antiinflamación y usos de los mismos
 <130> PP170019

 <160> 7
 55 <170> KopatentIn 2.0

 <210> 1
 <211>4
 <212> PRT
 60

ES 2 823 235 T3

<213> Péptido 1
<400> 1
Thr Met Arg Asp
1

5
<210> 2
<211> 5
<212> PRT
<213> Péptido 2
10
<400> 2
Asp Asn Cys Leu Arg
1 5

15
<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Péptido 3
<400> 3
Gly Val Gln His Gln Ala Ser Pro Tyr
1 5

20
<210> 4
<211> 21
<212> ADN
<213> Cebador directo de TNF-alfa
25
<400> 4
cgtcagccga ttrtgctatc t 21

30
<210> 5
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador inverso de TNF-alfa
35
<400> 5
cggactccgc aaagtctaag 20

40
<210> 6
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador directo de IL-2
45
<400> 6
ctcgcttct gtgtcacatt 20

50
<210> 7
<211> 20
<212> ADN
<213> Cebador inverso de IL-2
<400> 7
atcctgggga gtttcaggtt 20

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3.
- 5 2. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, teniendo el péptido actividad antiinflamatoria.
3. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido inhibe la expresión de una citoquina inflamatoria.
- 10 4. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la citoquina inflamatoria es al menos una seleccionada entre el grupo que consiste en TNF- α (factor- α de necrosis tumoral), IL-2 e INF- γ .
- 15 5. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido inhibe la expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2).
6. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido reduce la producción de ROS.
7. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido suprime la proliferación de células inflamatorias.
- 20 8. Un péptido de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el péptido suprime la activación de linfocitos T.
9. Una composición farmacéutica que comprende un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 10. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en medicina.
11. Un péptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 30 12. Una composición farmacéutica como se define en la reivindicación 9 para uso en la prevención o tratamiento de una enfermedad inflamatoria.
- 35 13. Un péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 11 o una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde la enfermedad inflamatoria es una cualquiera de dermatitis atópica, encefalitis, enteritis inflamatoria, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, choque hemorrágico pulmonar, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria, enfermedades inflamatorias crónicas por infecciones virales o bacterianas crónicas, colitis, enteropatía inflamatoria, diabetes de tipo 1, artritis reumatoide, artritis reactiva, osteoartritis, psoriasis, esclerodermia, osteoporosis, aterosclerosis, miocarditis, endocarditis, pericarditis, fibrosis quística, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, lepra, sífilis, enfermedad de Lyme, borreliosis, borreliosis neurogénica, tuberculosis, sarcoidosis, lupus, lupus discoide, lupus de sabañones, nefritis lúpica, lupus eritematoso sistémico, degeneración macular, uveítis, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, síndrome de Sjogren, fibromialgia, síndrome de fatiga crónica, síndrome de fatiga crónica y disfunción inmunitaria, encefalomiелitis miálgica, esclerosis lateral amiotrófica, enfermedad de Parkinson, y esclerosis múltiple.
- 40
- 45

Fig. 1a

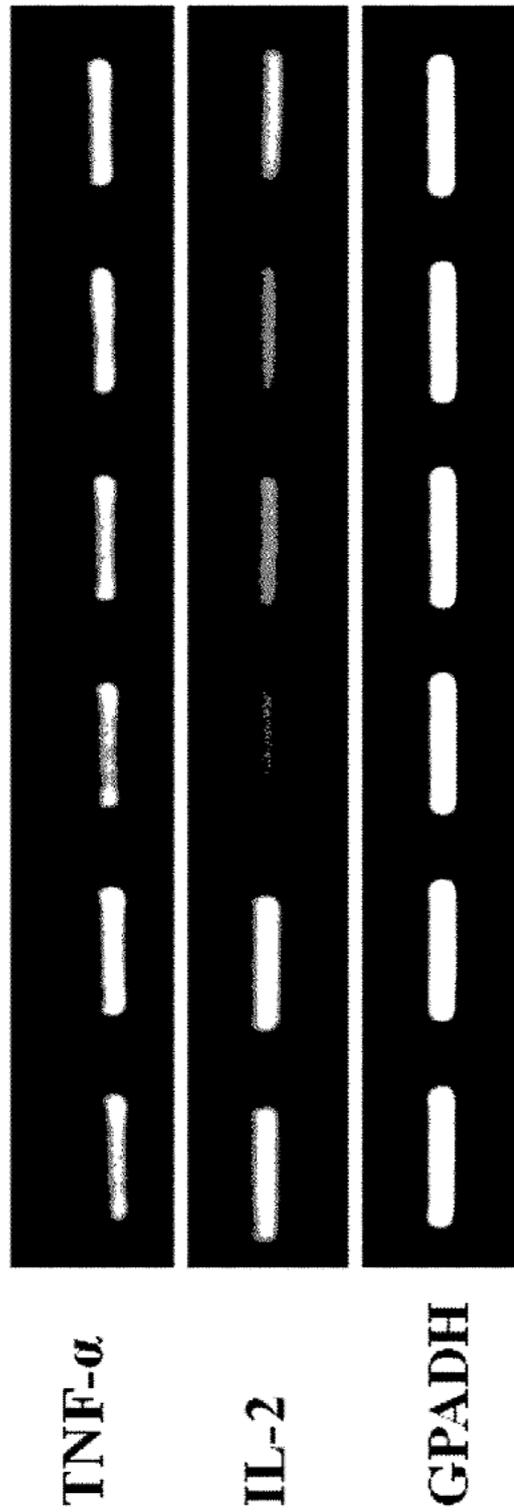


Fig. 1b

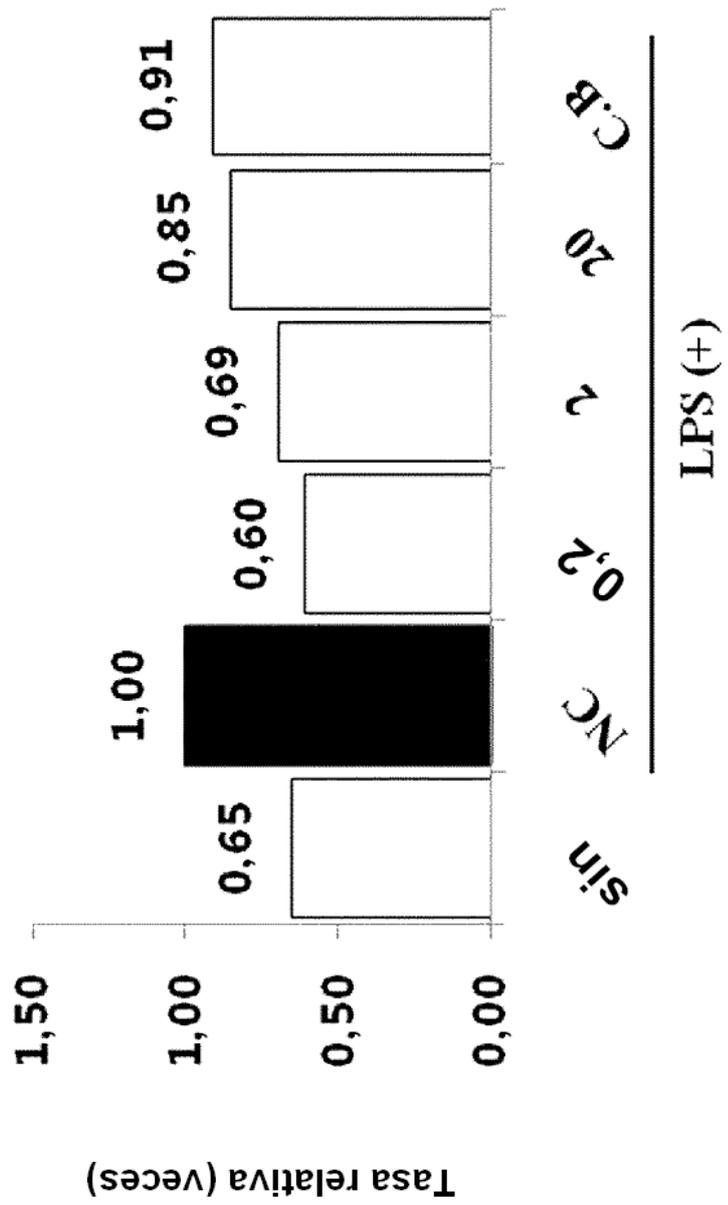


Fig. 1c

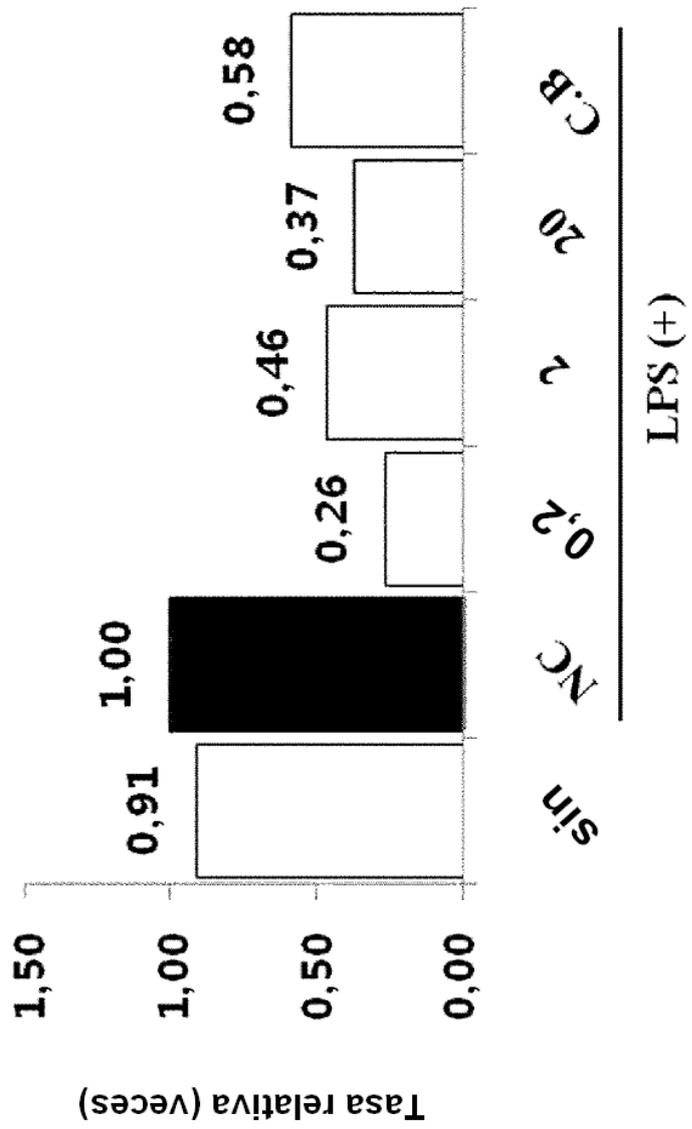


Fig. 1d

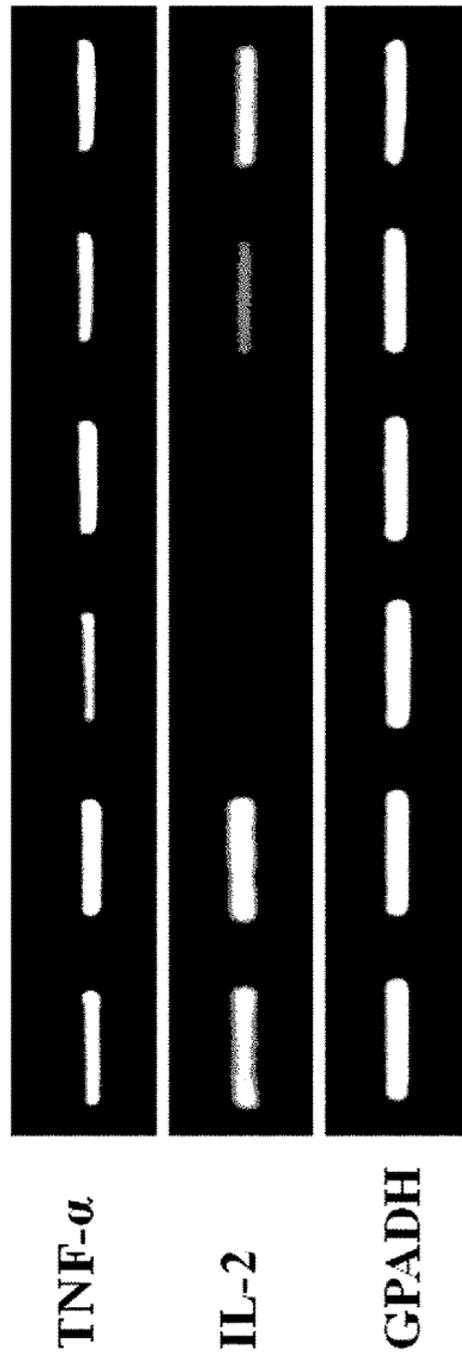


Fig. 1e

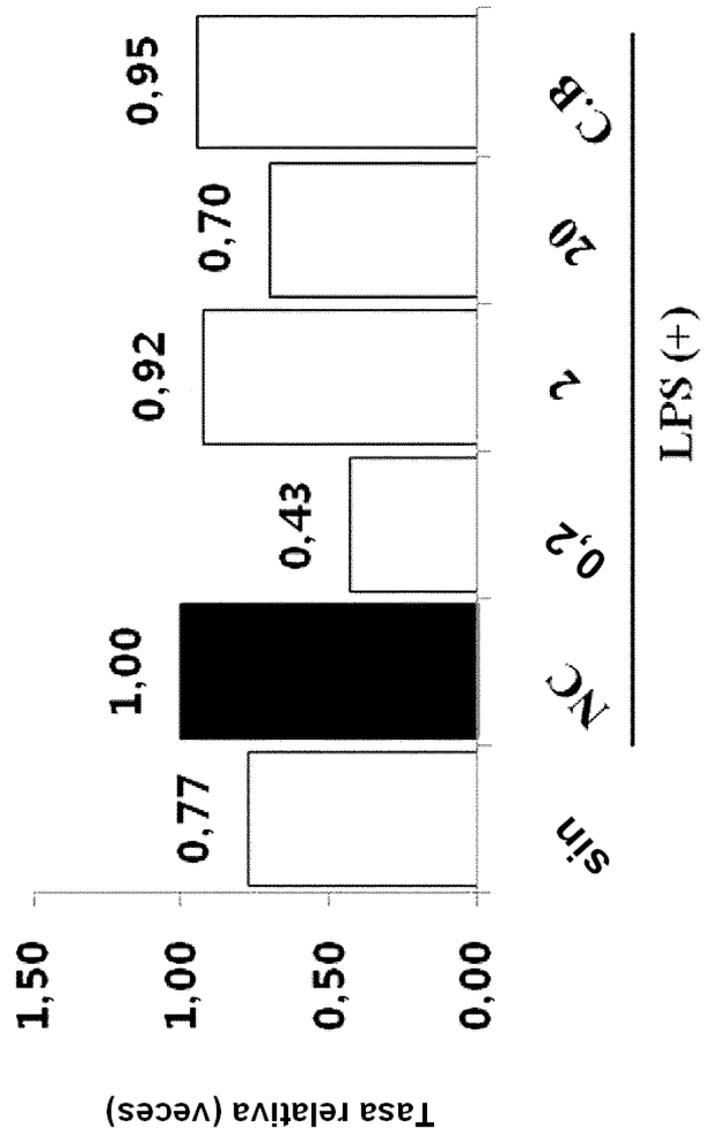


Fig. 1f

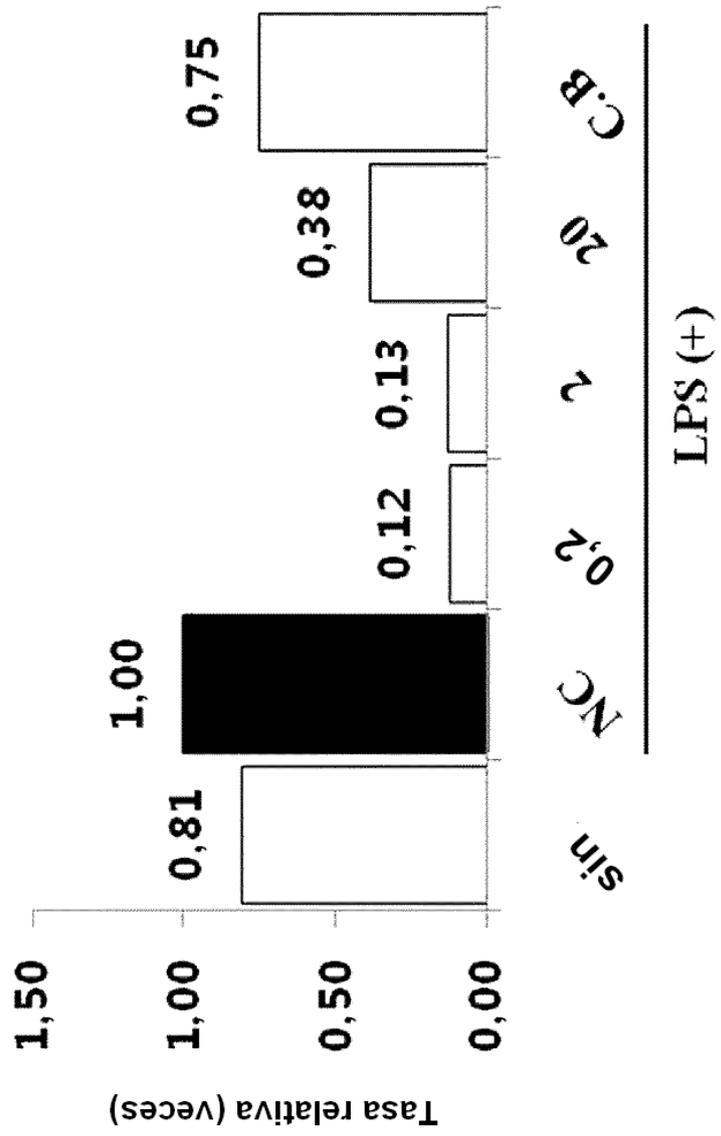


Fig. 1g

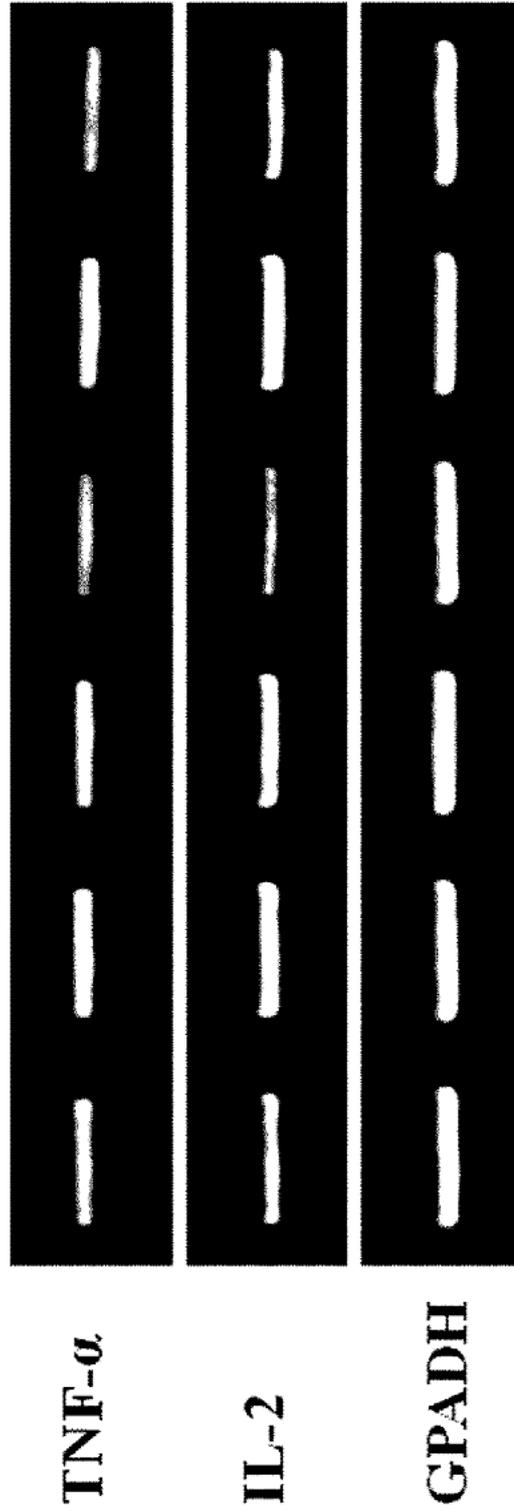


Fig. 1h

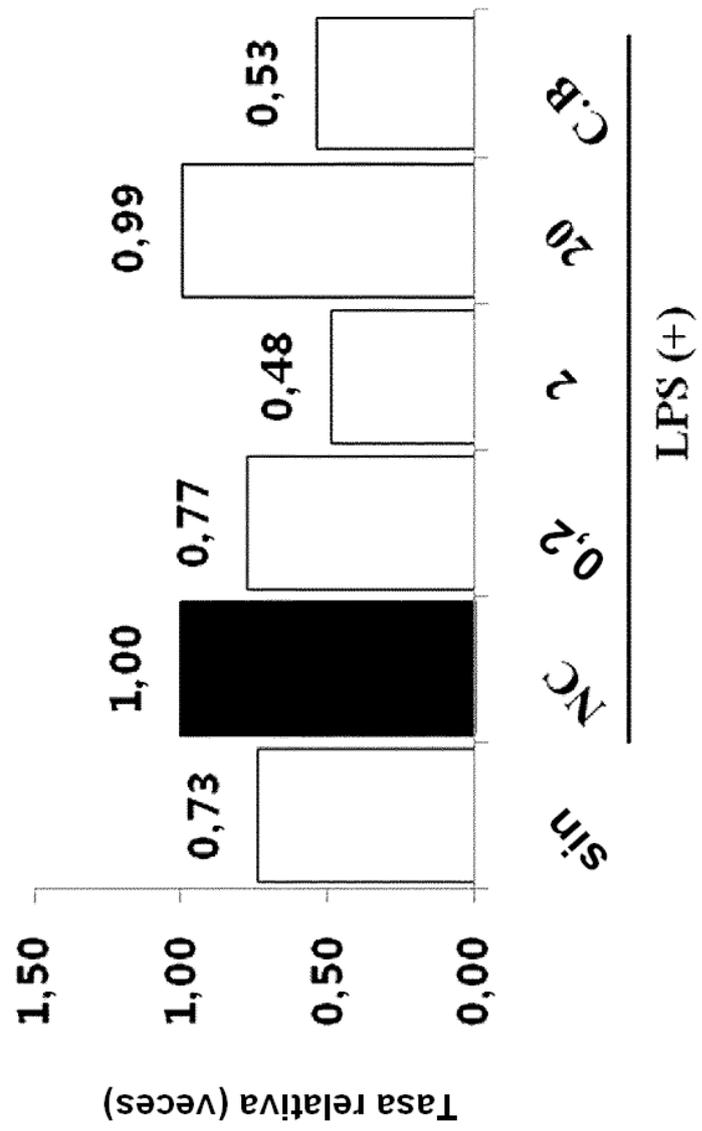


Fig. 1i

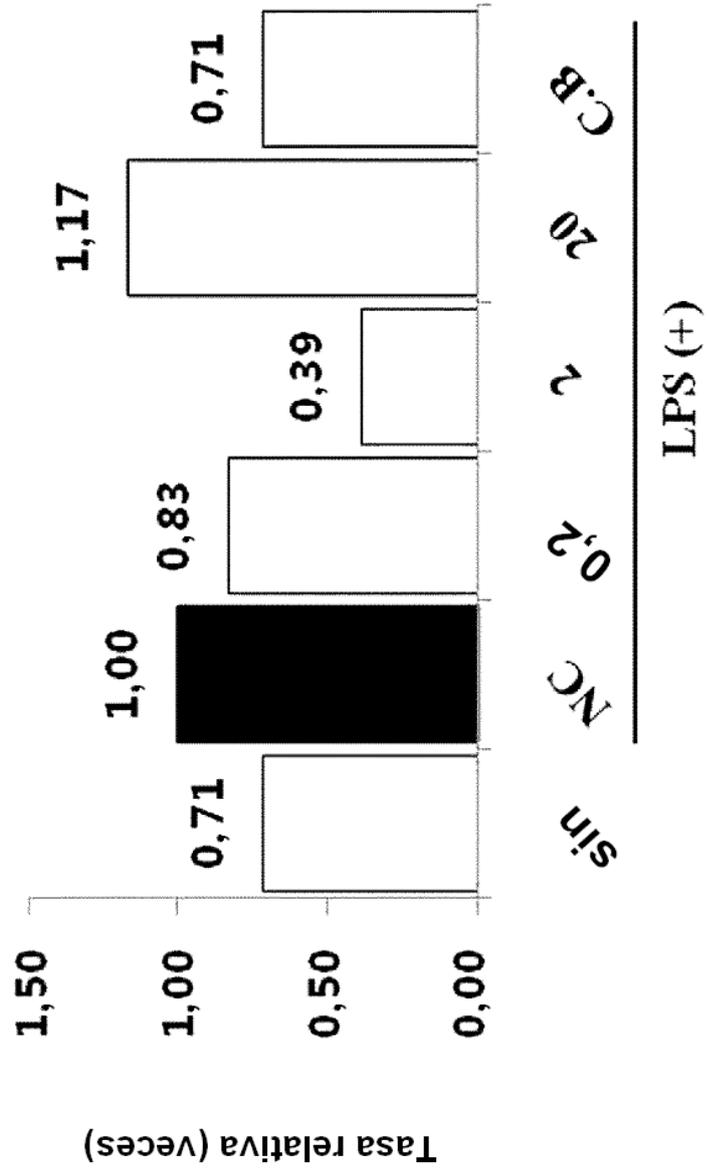


Fig. 2a



Fig. 2b

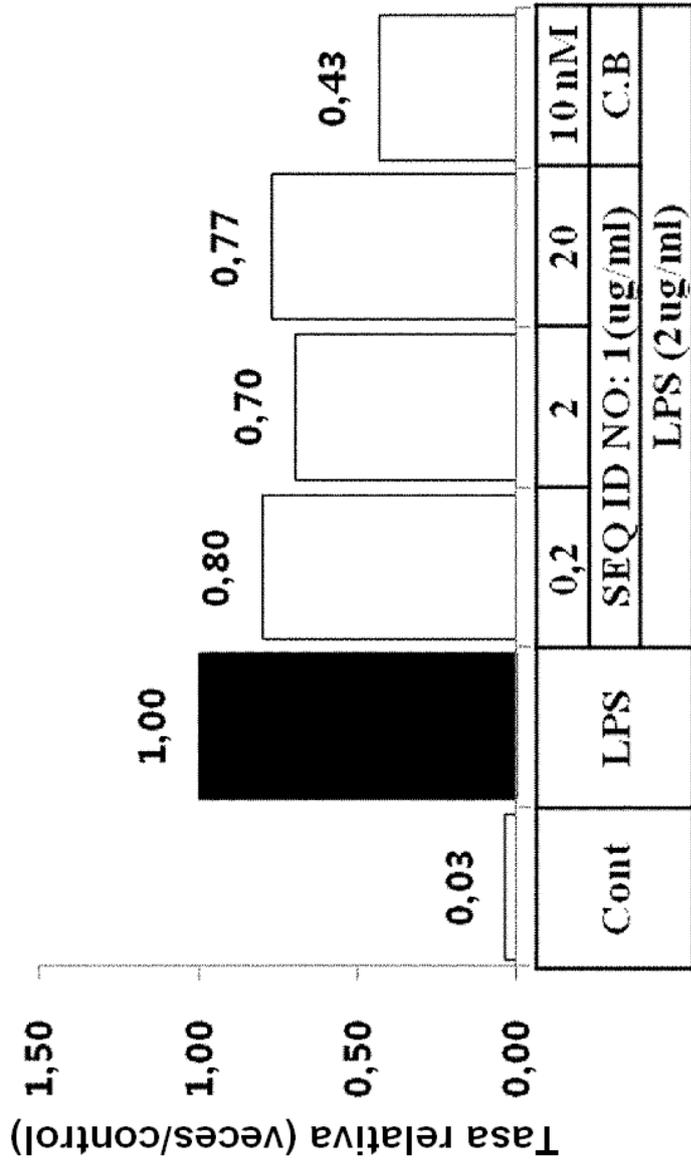


Fig. 2c



Fig. 2d

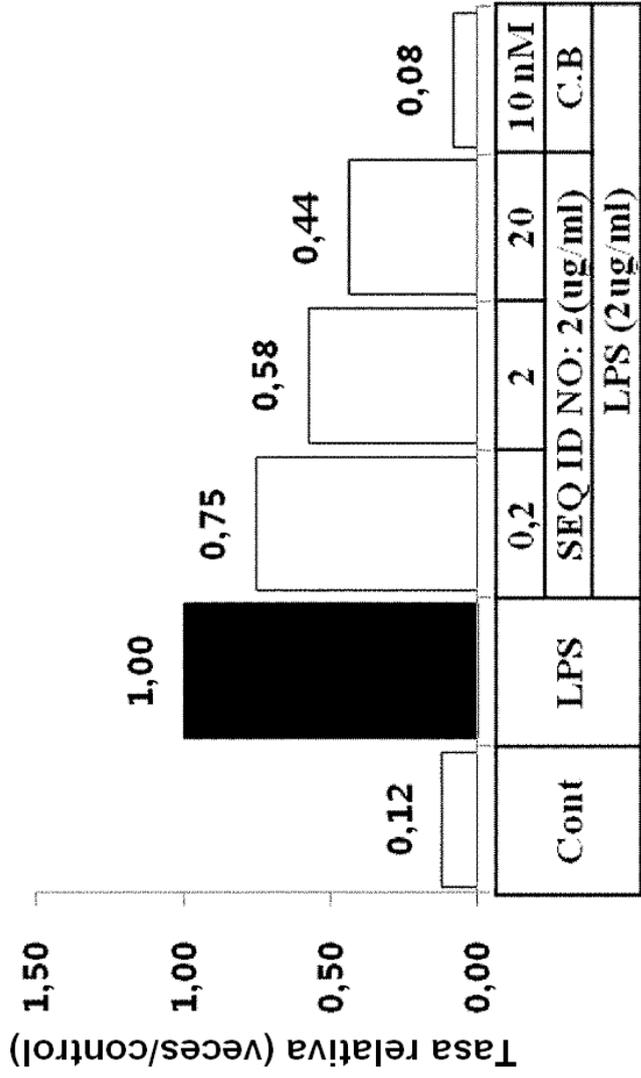


Fig. 2e



Fig. 2f

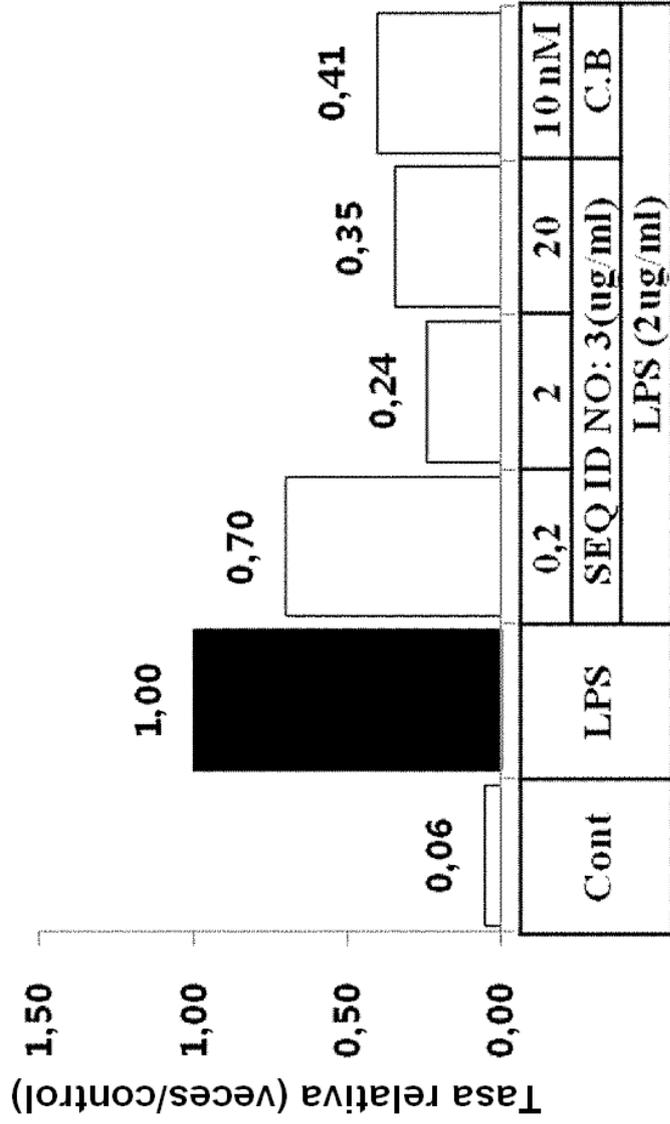


Fig. 3a

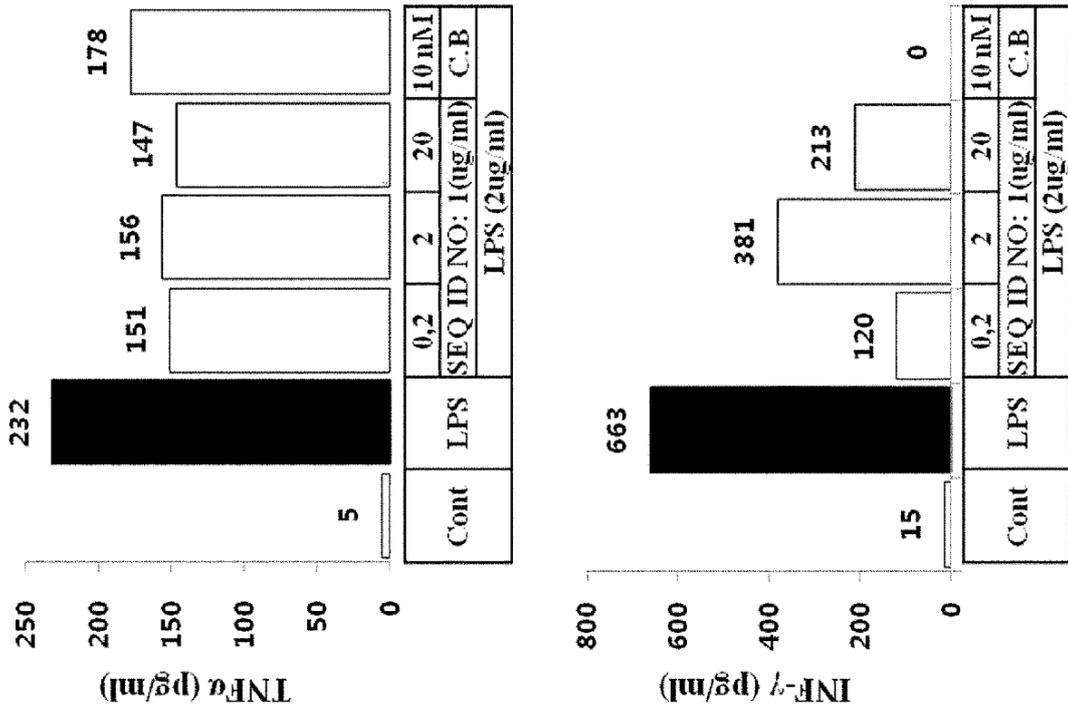


Fig. 3b

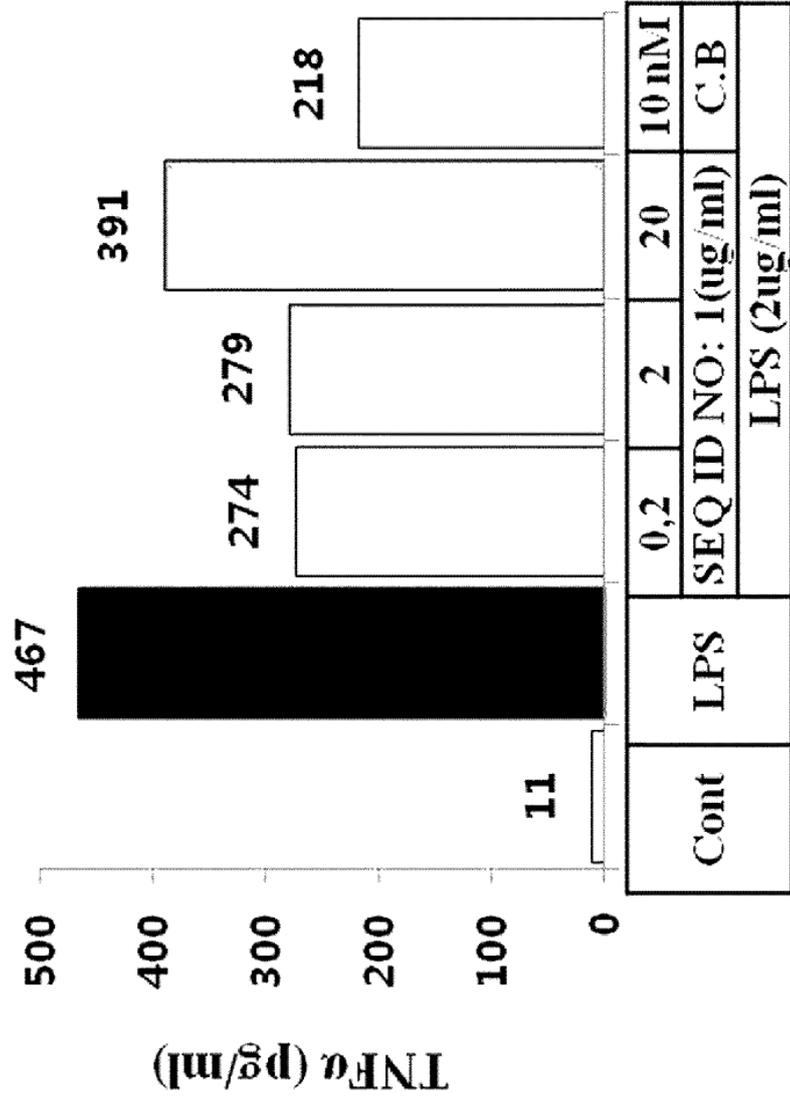


Fig. 3c

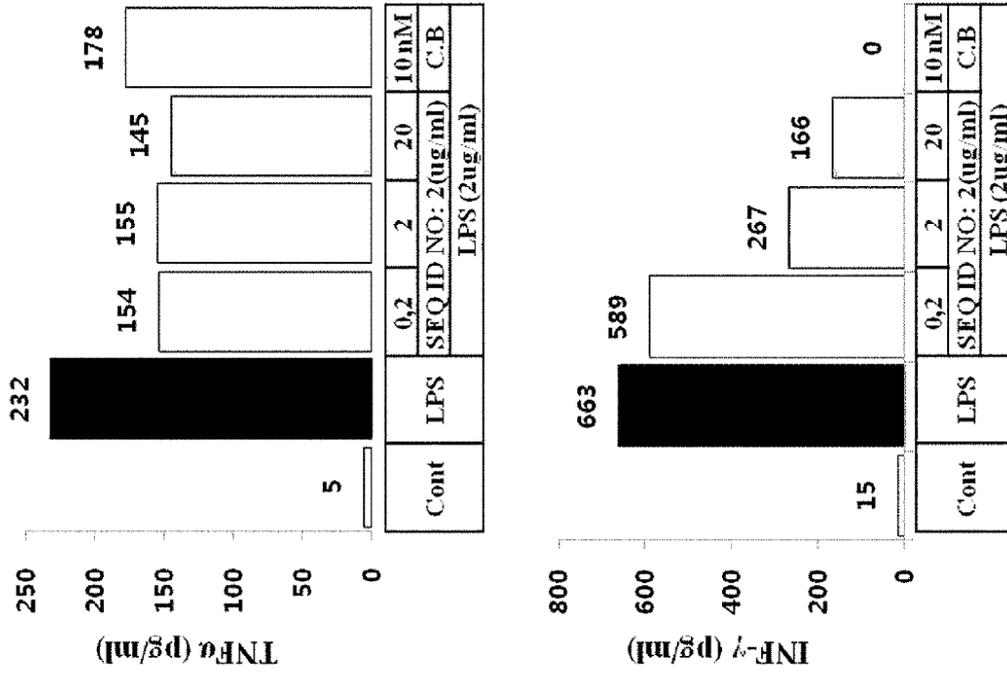


Fig. 3d

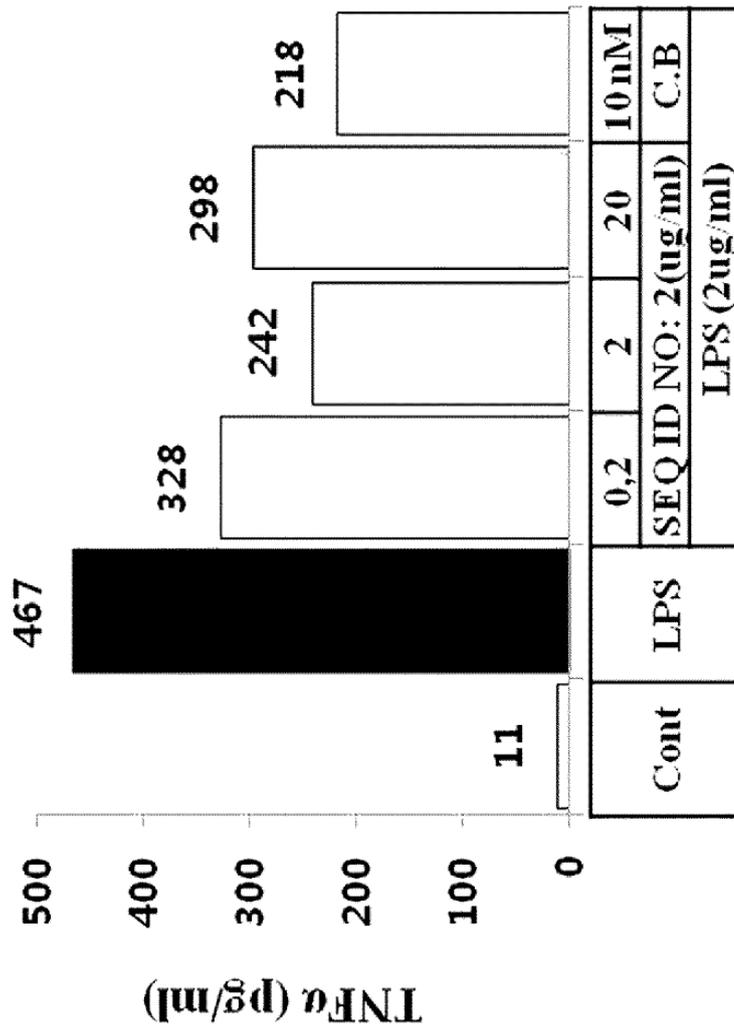


Fig. 3e

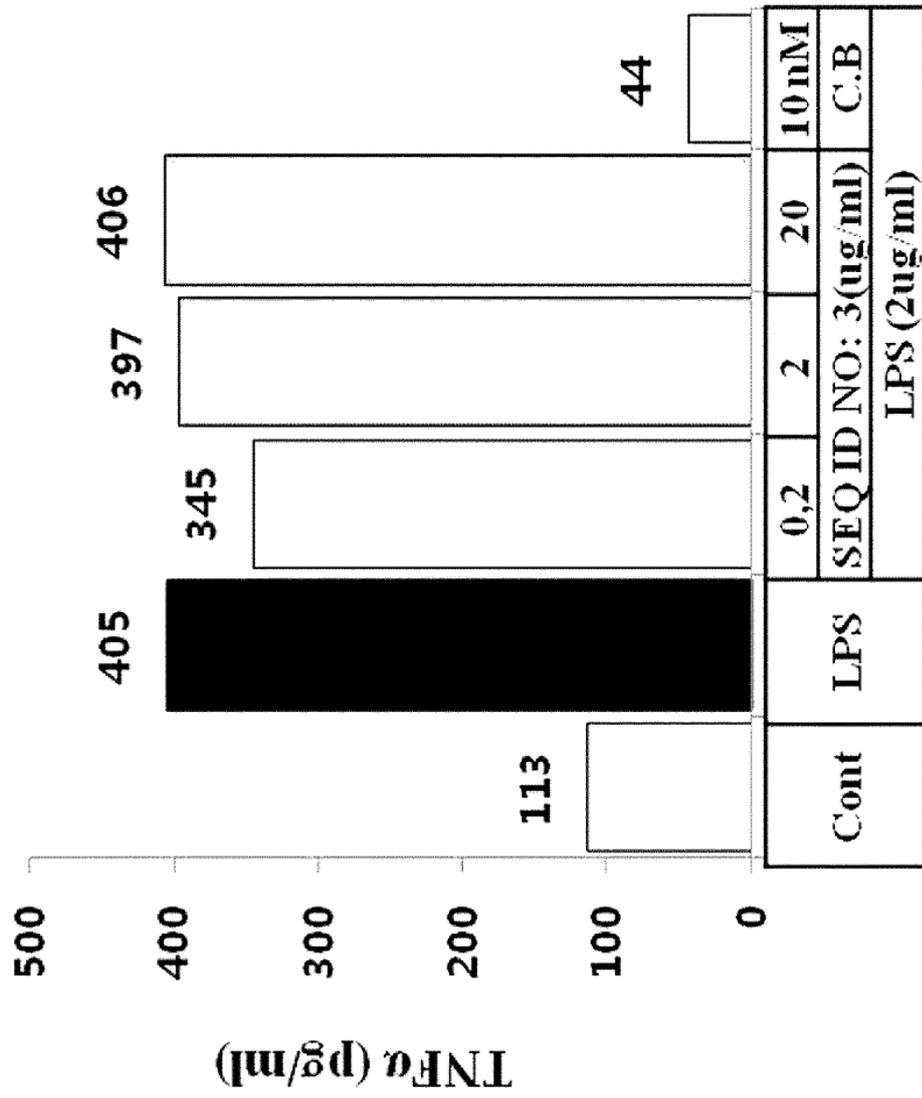


Fig. 4a

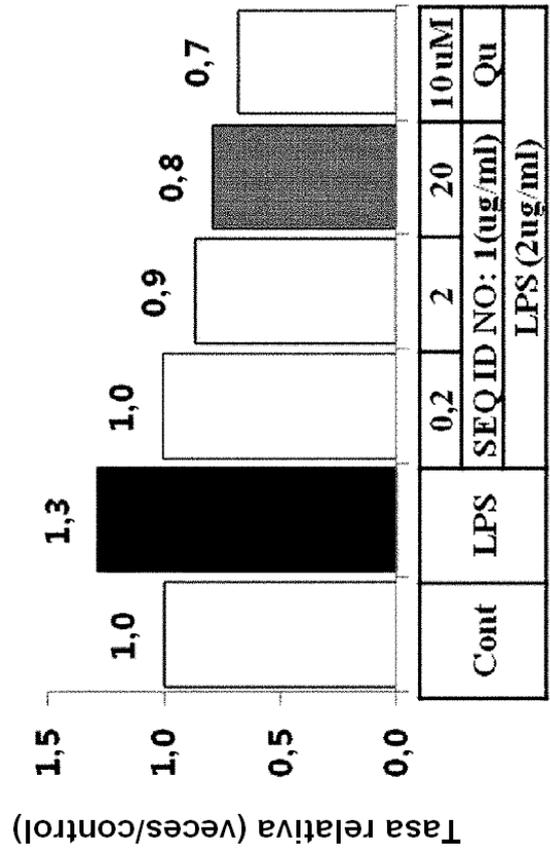
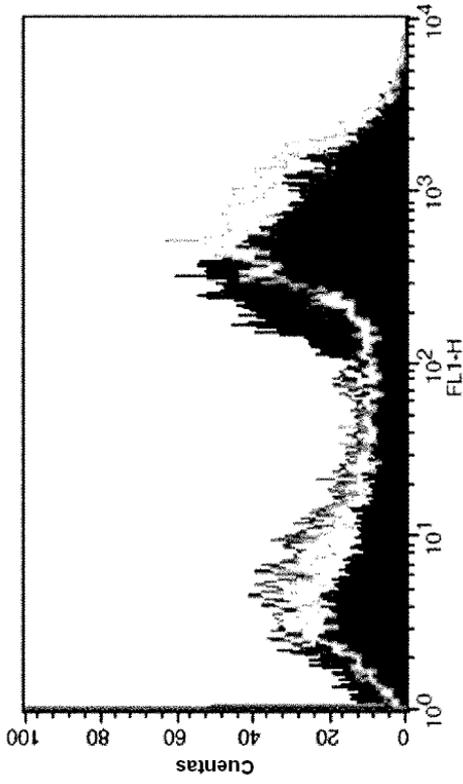


Fig. 4b

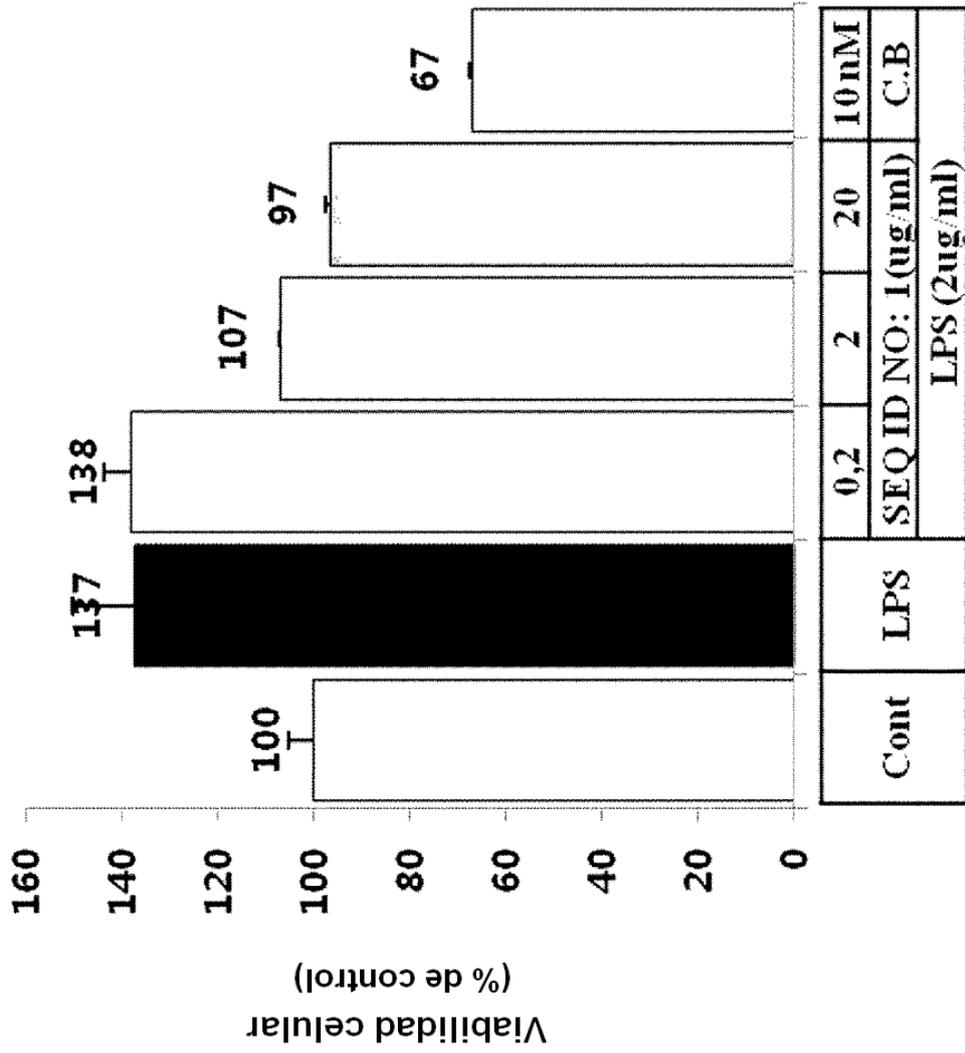
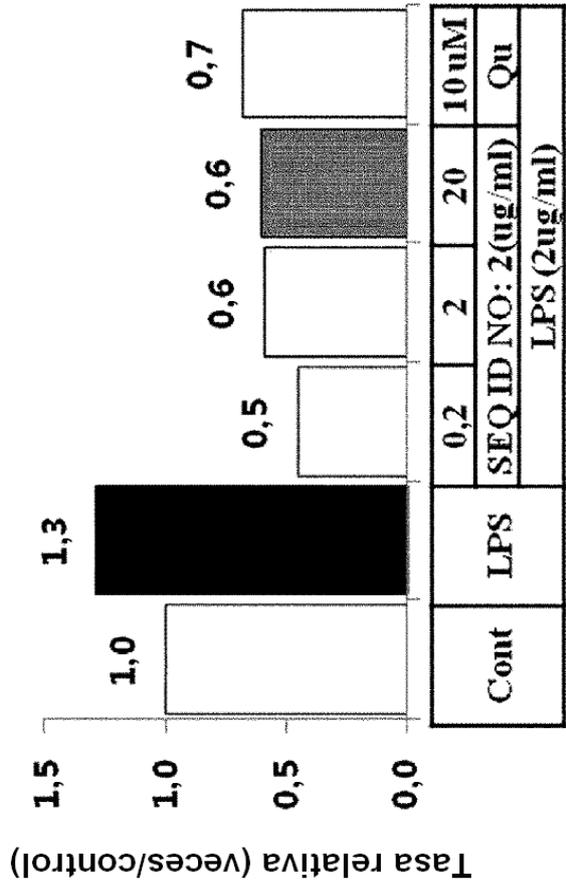
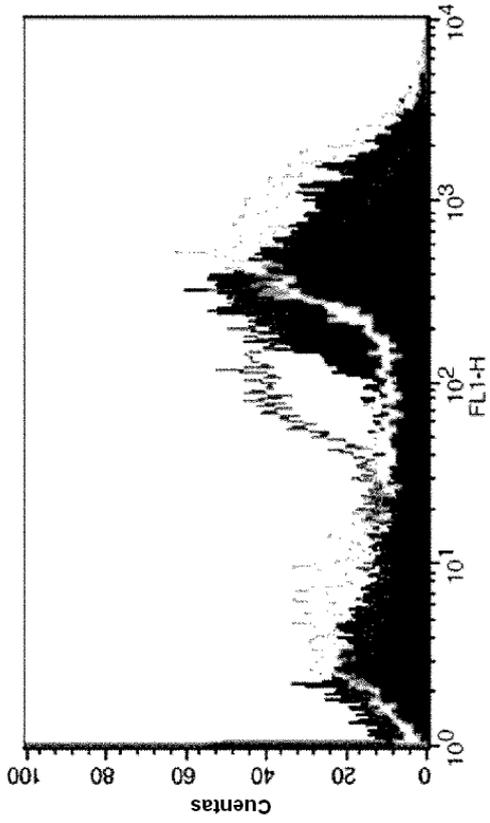


Fig. 4c



SEQ ID NO: 2 (µg/ml)	10 µM	Qu
LPS (2 µg/ml)		

Fig. 4d

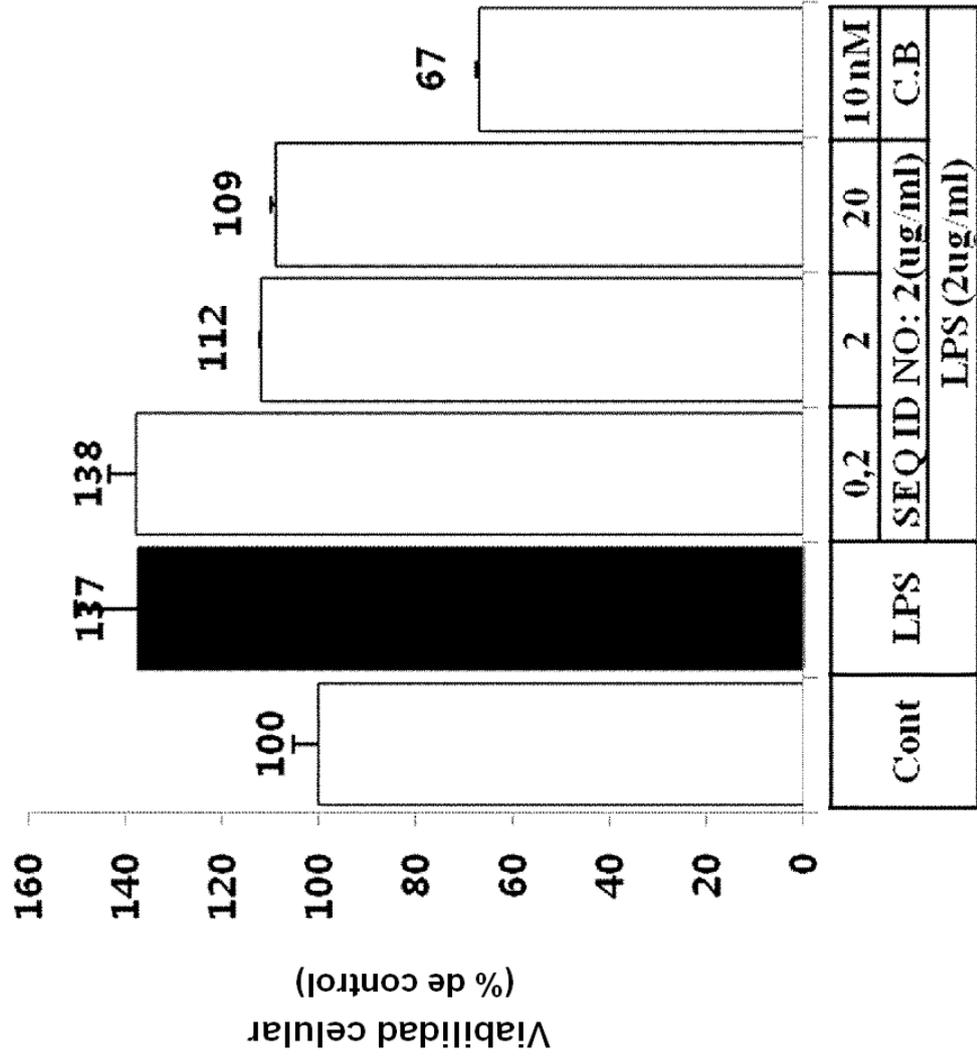


Fig. 4e

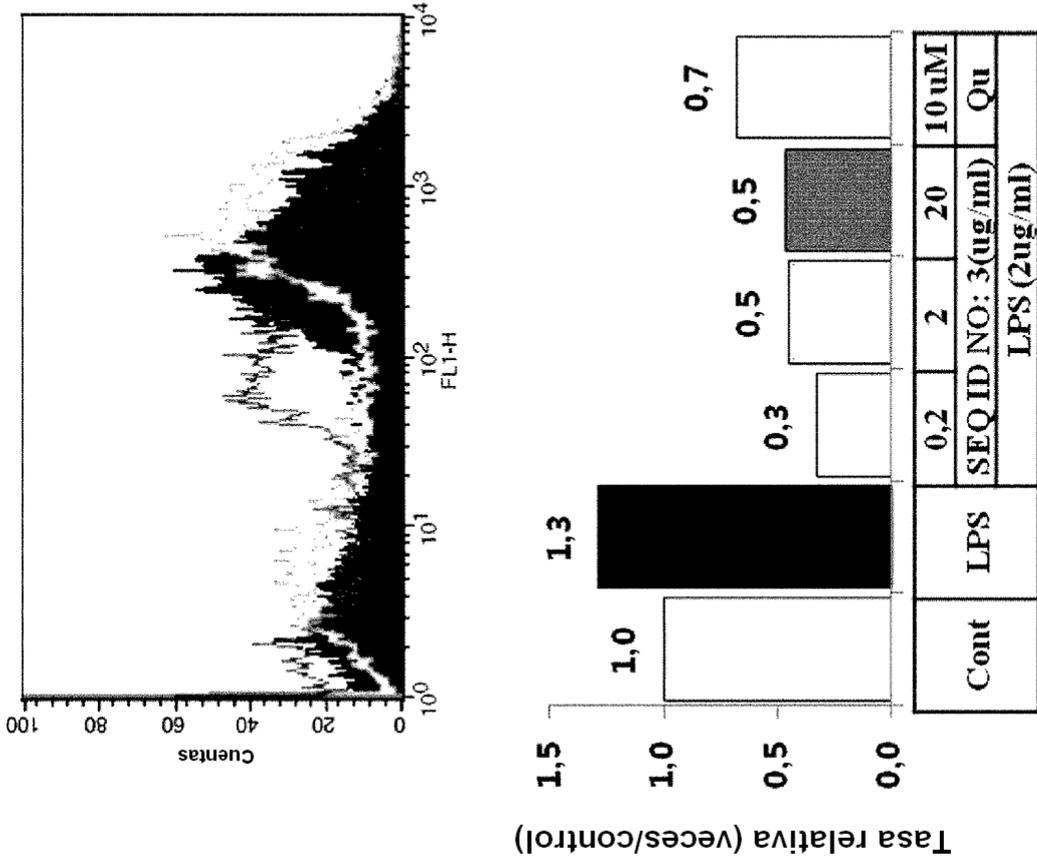


Fig. 4f

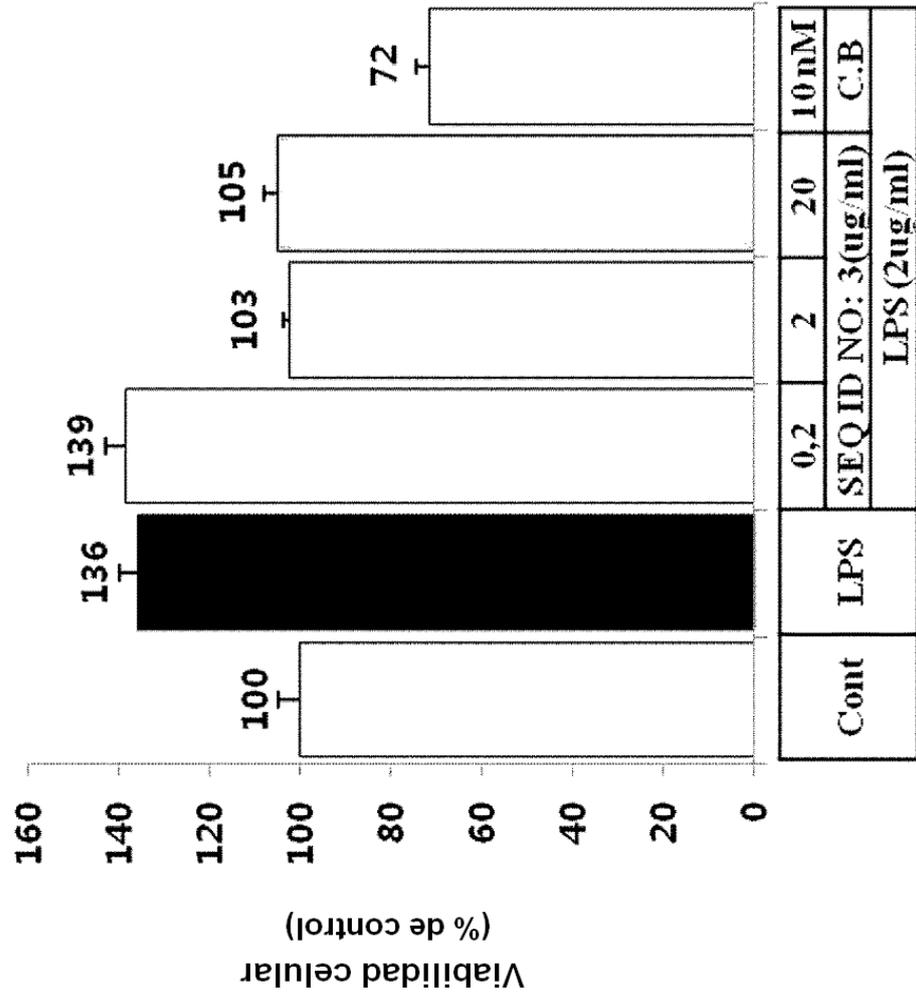


Fig. 5a

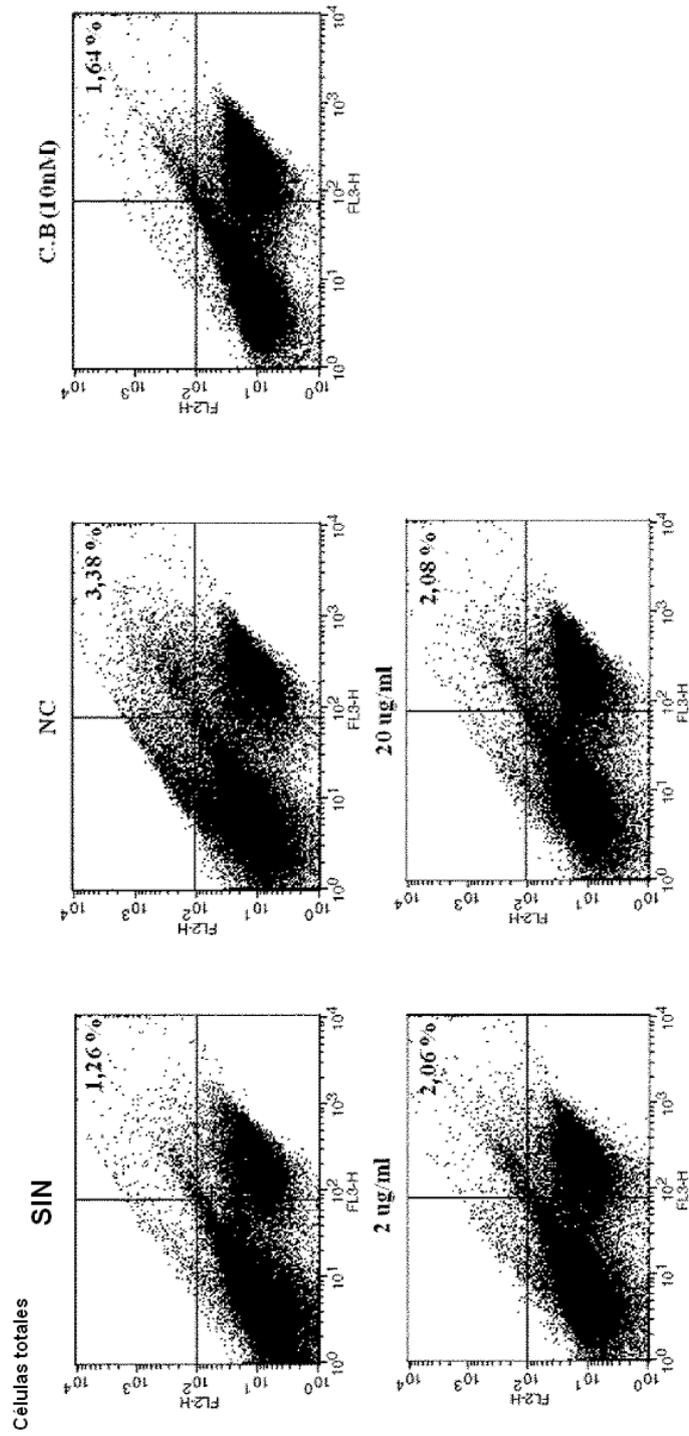


Fig. 5b

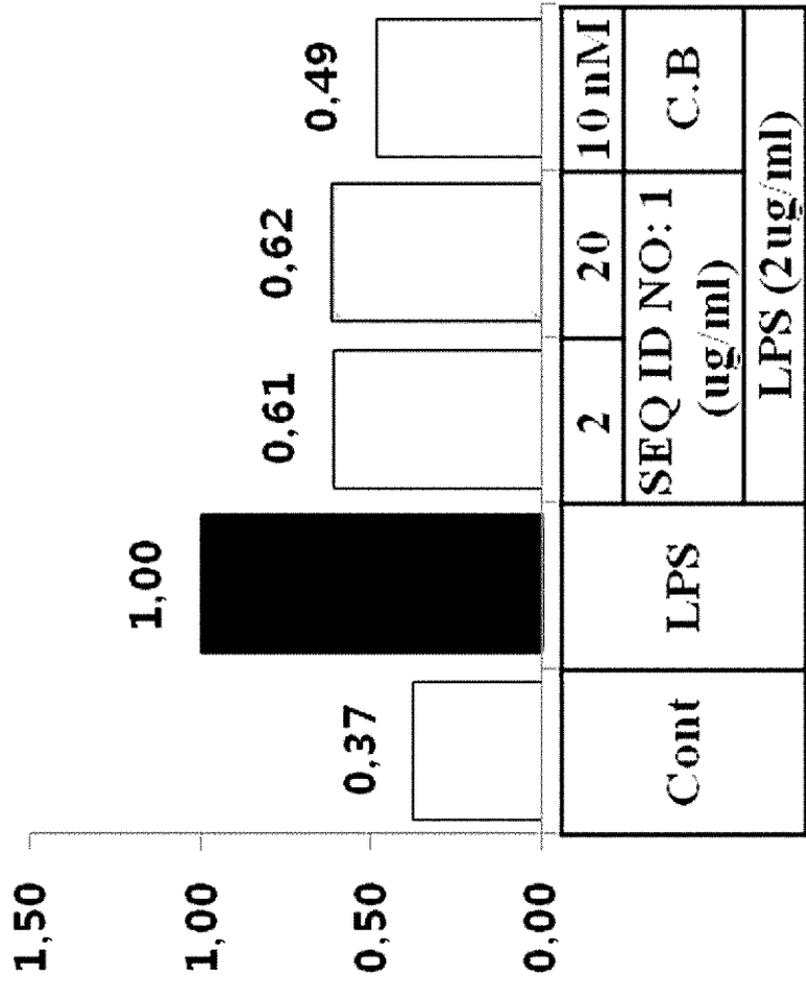


Fig. 5c

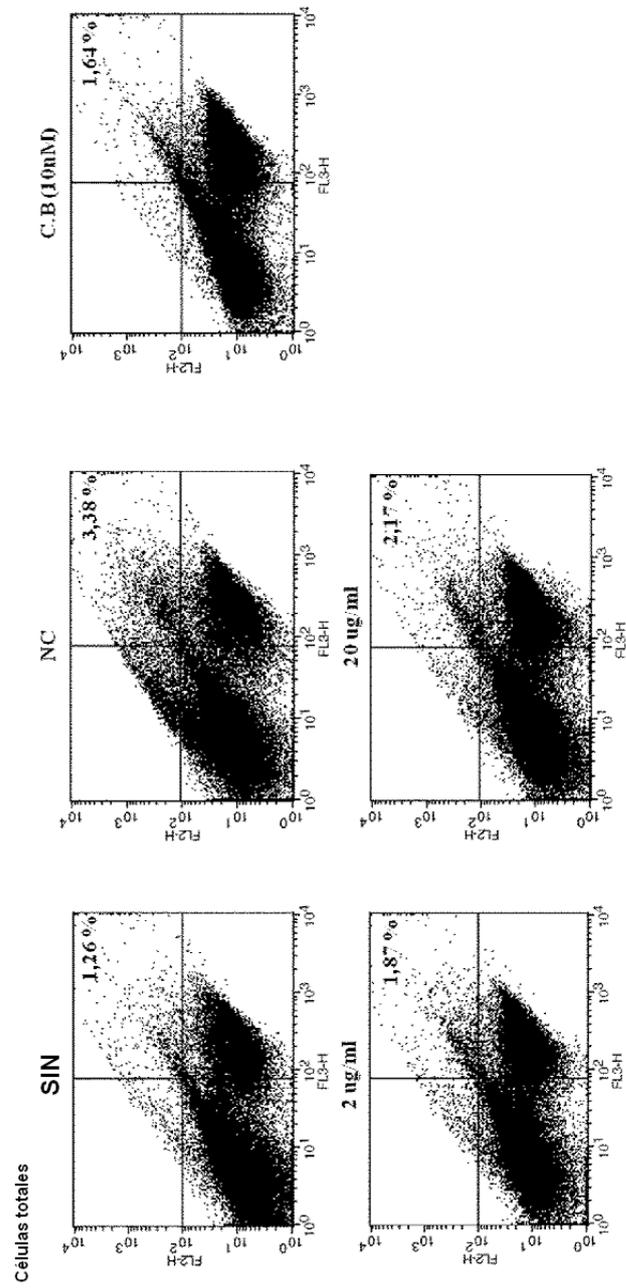


Fig. 5d

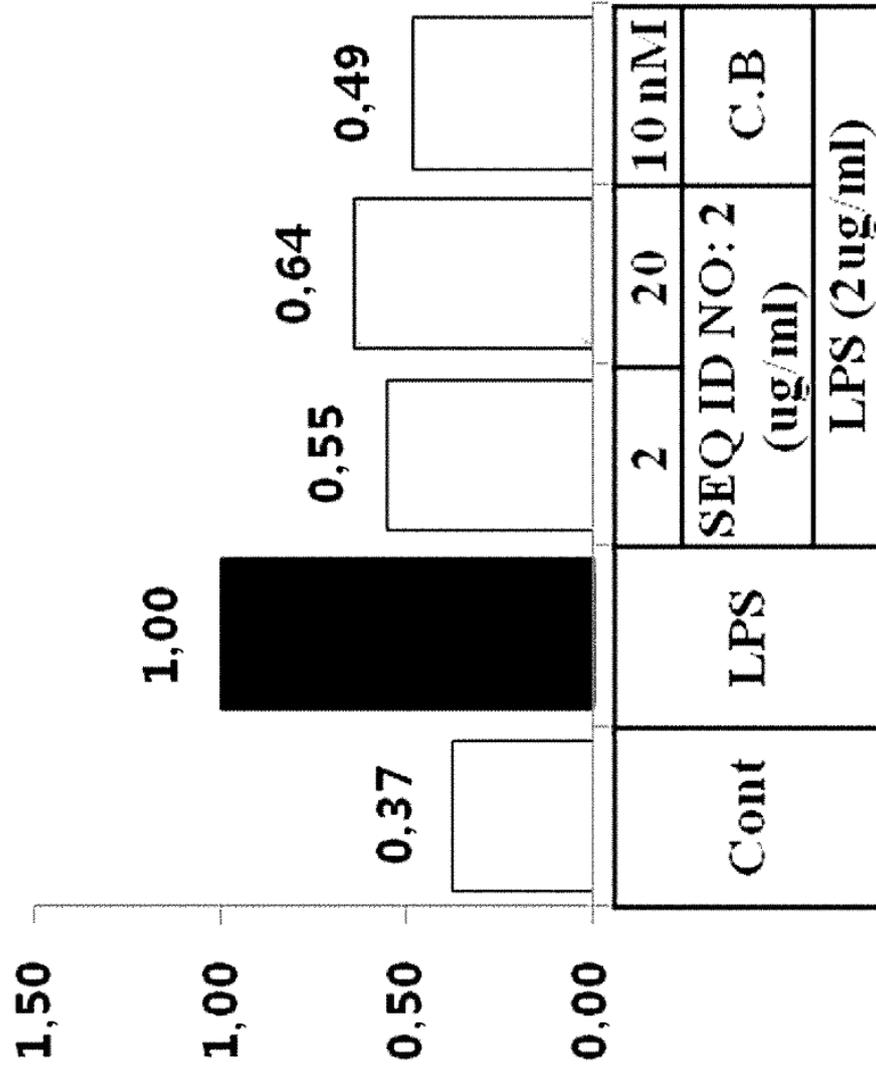


Fig. 5e

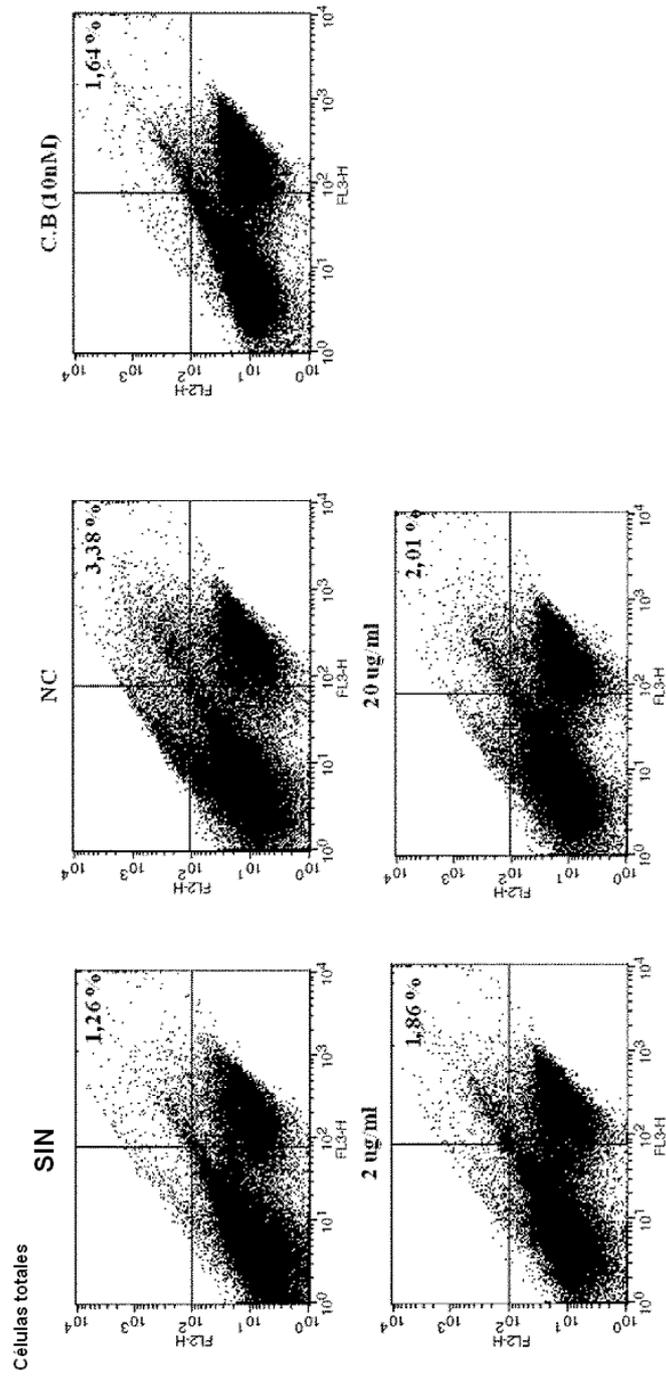


Fig. 5f

