

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 028**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.01.2013 PCT/US2013/020498**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013 WO13106273**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.01.2013 E 13700808 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.03.2018 EP 2802338**

54 Título: **Péptidos y procedimientos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

09.01.2012 US 201261584517 P
11.09.2012 US 201261699571 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
16.07.2018

73 Titular/es:

SERPIN PHARMA, LLC (100.0%)
14645 Sulky Run Ct
Nokesville, Virginia 20181, US

72 Inventor/es:

MOGELSVANG, SOREN y
GELBER, COHAVA

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 676 028 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Péptidos y procedimientos de uso de los mismos

- 5 **[0001]** La presente descripción presenta péptidos aislados y/o sintetizados. Específicamente, la presente descripción se refiere a una clase de fragmentos peptídicos aislados y/o sintetizados, y análogos sintéticos basados en los fragmentos peptídicos. Los péptidos pueden tener efectos preventivos y terapéuticos en enfermedades humanas y se pueden usar en el tratamiento de enfermedades humanas
- 10 **[0002]** Los inhibidores de la serina proteasa (serpinas) representan una gran familia (>1000) de inhibidores de proteasa, presentes en todas las ramas de la vida e implicadas en una multitud de procesos fisiológicos. En los mamíferos, como los seres humanos, las serpinas son importantes para la homeostasis y, aunque existe un cierto nivel de promiscuidad, cada serpina tiene una serina proteasa/proteasas cognadas. Por ejemplo, la alfa-1-antitripsina (AAT) y la alfa-1-antiquimotripsina (ACT) inhiben las proteasas inflamatorias, tales como la elastasa, mientras que la antitrombina inhibe la trombina y tiene una función en la coagulación.
- 15 **[0003]** Una serie de mutaciones específicas de AAT se manifiestan en enfermedades humanas, que incluyen la EPOC, trombosis y serpinopatías (cirrosis y demencia). Actualmente, la FDA aprueba un pequeño número de formulaciones de AAT derivadas de suero humano para el tratamiento de la EPOC. En este procedimiento terapéutico, la AAT funciona como un inhibidor de proteasa similar a la AAT endógena.
- 20 **[0004]** La AAT es la serpina arquetípica y comparte la estructura terciaria con otras serpinas. Las serpinas tienen un bucle expuesto de ~20 aminoácidos (aa), llamado bucle de centro reactivo (RCL), que sirve como cebo para las proteasas cognadas. Una vez que la proteasa se une al RCL, queda atrapada, parcialmente desplegada y destinada a la degradación. La escisión del RCL en su sitio P1-P1' dirige el proceso de inactivación de proteasa y da como resultado la liberación de un péptido C-terminal pequeño de la molécula de serpina.
- 25 **[0005]** Descubrimos inesperadamente que muchos de los péptidos C-terminales de la molécula de serpina y variantes y derivados de los mismos funcionan como potentes agentes antiinflamatorios. Por consiguiente, proporcionan composiciones peptídicas, composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de serpina C-terminales y procedimientos de uso de los péptidos para tratar afecciones inflamatorias y autoinmunitarias, que incluyen diabetes tipo II, lupus y enfermedad de injerto contra hospedante, uveítis, eccema y psoriasis, fibrosis quística, artritis reumatoide (AR), síndrome de radiación agudo y pacientes con quemaduras, enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y diabetes de tipo I de inicio temprano.
- 30 **[0006]** La invención se basa en nuestro descubrimiento de que un péptido corto, SP16 (SEQ ID NO: 1) derivado de la alfa-1-antitripsina humana muestra propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras similares a la proteína original mucho más grande, la alfa-1-antitripsina. Sin querer estar limitado por una teoría, parece que SP16 es un interruptor general peptídico, el primero en su clase, para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias y metabólicas.
- 35 **[0007]** Específicamente, hemos demostrado la función del péptido SP16 que consiste en una secuencia de aminoácidos VKFNKPFVFLMIEQNTK (SEQ ID NO: 1) en modelos animales bien establecidos para al menos la diabetes tipo II, artritis reumatoide y endotoxemia letal.
- 40 **[0008]** Por consiguiente, describimos una composición que comprende un péptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de aminoácidos X1-Z1-F-N-K-P-F-X2-Z2-X3-Z3-Q (SEQ ID NO: 2), en la que
- 45 X1 es V o L;
X2 es V, L o M;
X3 es M, I o V;
Z1 es cualquier aminoácido;
Z2 es una secuencia de dos aminoácidos cualesquiera; y
- 50 Z3 es una secuencia de cinco aminoácidos, y en la que el péptido aislado consiste en 37 o menos aminoácidos.
- 55 **[0009]** El péptido se puede modificar para prolongar la vida útil y/o la biodisponibilidad usando uno o más enlaces peptídicos o aminoácidos no naturales o uniendo al péptido grupos funcionales, tales como, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

[0010] La composición puede comprender además un vehículo, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 **[0011]** El péptido según la SEQ ID NO: 1 se puede usar para reducir los niveles de TNF- α en el suero en individuos humanos que tienen niveles de TNF- α aumentados por patologías. Por lo tanto, la descripción proporciona un procedimiento o uso para reducir los niveles de TNF- α en un ser humano que lo necesite, que comprende administrar al individuo humano el péptido de la invención en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el péptido aislado da como resultado una disminución de 50 % o 75 % en los niveles de
10 TNF- α en el suero cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano en comparación con los niveles antes de la administración del polipéptido aislado. En otras realizaciones, el péptido aislado comprende además al menos otra proteína. La combinación de las al menos dos proteínas se puede denominar proteína de fusión. La otra proteína se puede seleccionar a partir de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida. El péptido puede comprender tanto un marcador de epítipo como un prolongador de la semivida.

15 **[0012]** También describimos una composición que comprende un péptido aislado que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos X1-Z1-F-N-X2-P-F-X3-Z2-X4-Z3-X5 (SEQ ID NO: 3), en la que

X1 es V o L;
20 X2 es K o R;
X3 es V, L o M;
X4 es M, I o V;
X5 es K o Q;
Z1 es cualquier aminoácido;
25 Z2 es una secuencia de dos aminoácidos cualesquiera;
Z3 es una secuencia de cinco aminoácidos cualesquiera; y

en el que el péptido aislado produce una disminución de 75 % en los niveles de TNF- α en el suero cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano en comparación con la cantidad de niveles de TNF- α antes de
30 administrar el péptido.

[0013] Se describe que el péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos XI-Z1-FN-X2-PF-X3-Z2-X4-Z3-X5 (SEQ ID NO: 3), en la que X1, X2, X3, X4, X5, Z1, Z2 y Z3 se definen como antes y en la que el péptido consiste en, como máximo, 35, 22 o 21 restos de aminoácidos.
35

[0014] En ciertos aspectos, los péptidos descritos en este documento y a lo largo de la memoria descriptiva también comprenden al menos otra proteína. La combinación de estas al menos dos proteínas se puede denominar una proteína de fusión. Específicamente, la otra proteína se puede seleccionar de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, el péptido aislado
40 puede comprender tanto un marcador de epítipo como un prolongador de la semivida.

[0015] La descripción también proporciona un péptido aislado que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos RFNRPFLR (SEQ ID NO: 4) y RFNKPFLR (SEQ ID NO: 5). En algunas realizaciones, el péptido aislado produce una disminución de 50 % o 75 % en los niveles de TNF- α en el suero en
45 comparación con la cantidad de niveles de TNF- α antes de administrar el péptido cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano.

[0016] En otros aspectos descritos en este documento, el péptido aislado se une a otra proteína. La combinación de estas proteínas se puede denominar una proteína de fusión. Específicamente, la otra proteína se
50 puede seleccionar de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida.

[0017] En algunos aspectos descritos en este documento, el péptido aislado consiste en, como máximo, 100, 35, 22, 21 o 9 aminoácidos adicionales.

55 **[0018]** El péptido aislado descrito en este documento consiste esencialmente en, o consiste en la secuencia de aminoácidos de Z1-RFNRPFLR-Z2 (SEQ ID NO: 6) y Z1-RFNKPFLR-Z2 (SEQ ID NO: 7), en las que Z1 y Z2 son independientemente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos.

[0019] El péptido aislado descrito en este documento consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de RRRFNRPFLLRRR (SEQ ID NO: 8) y RRRFNKPFLRRR (SEQ ID NO: 9).

[0020] La descripción también proporciona una composición que comprende un péptido aislado que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos de FNRPFLL (SEQ ID NO: 10) y FNKPFL (SEQ ID NO: 11).

[0021] La descripción también proporciona una composición que comprende un péptido aislado o sintetizado que consiste esencialmente en o que consiste en uno cualquiera o una combinación de los siguientes péptidos: SP40; SP43; SP46; y SP49 como se expone en la tabla B, y su uso en procedimientos para tratar la inflamación, artritis reumatoide, EPOC, fibrosis quística, mejorar el control glucémico en sujetos diabéticos y prevenir y tratar la endotoxemia, por ejemplo, en víctimas de quemaduras y sujetos expuestos a radiación aguda.

[0022] La descripción también proporciona un procedimiento para disminuir el TNF- α en el suero en comparación con la cantidad de niveles de TNF- α antes de administrar el péptido a un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de cualquiera de los péptidos aislados como se ha definido antes para disminuir los niveles de TNF- α en el suero en al menos 50 %. En una realización, los niveles de TNF- α en el suero se reducen en 75 % en comparación con la cantidad de niveles de TNF- α antes de administrar el péptido. En otras realizaciones, el sujeto es un mamífero. En algunos aspectos descritos en este documento, el mamífero es un ser humano.

[0023] La descripción proporciona procedimientos para mejorar el control glucémico o reducir la hiperglucemia en un sujeto que lo necesite, que comprenden administrar al sujeto con hiperglucemia cualquiera de los péptidos descritos en este documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0024] En algunos aspectos descritos en este documento, al ser humano se le ha diagnosticado diabetes tipo II, diabetes de tipo I de inicio nuevo, artritis reumatoide, EPOC, fibrosis quística, uveítis, eccema, psoriasis, lupus, enfermedad de injerto contra hospedante, enfermedad inflamatoria intestinal (EII), o endotoxemia, después de exposición a radiación aguda o quemaduras antes de administrar el péptido.

[0025] En algunos aspectos, el ser humano no ha sido sometido a tratamiento previo con alfa-antitripsina, tal como tratamiento con alfa-1-antitripsina antes del tratamiento con los péptidos de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0026]

La **figura 1** es una tabla que muestra las secuencias y la homología de los péptidos C-terminales de serpina (SEQ ID NO: 18-24, respectivamente, en orden de aparición).

La **figura 2** es una tabla que muestra péptidos derivados de truncamientos (SEQ ID NO: 25-32, 1, 33-34, 1, 33, 38-51, 10 y 8, respectivamente, en orden de aparición).

La **figura 3** es una gráfica de barras que muestra los niveles de TNF- α en la sangre de ratones a los que se inyectaron 0,5, 0,1, 0,02 o 0,004 mg de diferentes péptidos (SP1-SP18 de izquierda a derecha en el eje x). Cada péptido se administró en cuatro concentraciones diferentes. Las cuatro barras para cada uno de los péptidos de izquierda a derecha representan las concentraciones desde la más alta (0,5 mg) a la más baja (0,004 mg).

La **figura 4** es una gráfica de barras que muestra los niveles de TNF- α en la sangre de ratones a los que se inyectaron 0,004 mg de diferentes péptidos.

La **figura 5** es una gráfica lineal que muestra puntuaciones acumuladas de la pata para el tratamiento simulado, tratada con dexametasona y el péptido (SEQ ID NO: 1, también denominado SP16) en un modelo de rata con artritis inducida por anticuerpo contra colágeno (CAIA).

La **figura 6** es una gráfica lineal que muestra puntuaciones acumuladas de la pata para el tratamiento simulado, tratada con dexametasona y el péptido (SEQ ID NO: 1, también denominado SP16) en un modelo de rata con artritis inducida por anticuerpo contra colágeno (CAIA).

La **figura 7** es una gráfica que resume la supervivencia durante un estudio de endotoxemia letal en ratones. Se inyectaron a los animales 0,6 mg/kg de SP16 (SEQ ID NO: 1) como se indica: 2 horas antes, en el momento de, y/o 0,5 horas después de la inducción de septicemia. La septicemia se indujo por inyección de 15 mg/kg de LPS en T = 0. La supervivencia se controló en los tiempos de medición indicados. La supervivencia a las 72 horas era del 60 % en el grupo que recibió SP16 en T = -2, 0 y 0,5 horas.

Las **figuras 8A-8F** muestran gráficas que resumen los datos de un estudio en el modelo db/db T2DM. Se asignaron ratones db/db de cinco semanas a grupos de 10 animales, y se les inyectó vía IP 0,6 mg/kg de SP16 (dos veces por semana), 15 mg/kg de rosiglitazona (dos veces por semana) o control de vehículo durante 5 semanas. Los niveles de HbA1c (figura 8A) y péptido C (figura 8B) se determinaron al final del estudio. Durante la última semana del estudio, se administró una prueba de tolerancia a la glucosa (figura 8C). La glucosa en sangre no en ayunas se midió dos veces por semana durante todo el estudio y se redujo significativamente en los grupos de SP16 (SEQ ID NO: 1) y rosiglitazona. Los valores representan medias, con los errores estándar indicados. (*) indica $P < 0,05$ y (**) $p < 0,01$, comparado con el grupo simulado mediante una prueba T. La figura 8D resume la extensión de la hiperplasia de islotes en el estudio de db/db como se evaluó mediante morfometría. Las figuras 8E y 8F resumen los niveles séricos de CRP y TGF-beta en el modelo de ratón db/db de diabetes tipo II. Los menores niveles de CRP en el suero son consistentes con el tratamiento con el péptido que promueve un perfil de citoquinas antiinflamatorias. Ratones db/db diabéticos de ocho semanas de edad se asignaron en grupos de 8. El grupo recibió solución salina (simulado) o 0,6 mg/kg de SP16 dos veces por semana durante 12 semanas. Se determinaron los niveles combinados de CRP y TGF-beta en el suero para cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ comparado con el grupo de control de vehículo.

La **figura 9** es una gráfica que resume los datos de un estudio en el modelo de artritis reumatoide de CAIA de ratón. La gráfica muestra las puntuaciones acumuladas de hinchazón para todas las patas en el pico de la enfermedad (día 7) para grupos de 5 animales. Se inyectó por vía IV a ratones Balb/c un cóctel de anticuerpos de colágeno (MD BioSciences) el día 0 y se les inyectó LPS por vía IP el día 3. Los animales de control normales no recibieron inyecciones y sirvieron como control de valor base sin enfermedad. La inyección diaria de SP16 proporcionó una protección equivalente a la dexametasona.

La **figura 10** muestra niveles de TNF-alfa en ratones expuestos a LPS. En la figura 10A, los ratones se trataron con péptido SP16 de barrido de alanina. La dexametasona sirvió como control positivo del «tratamiento efectivo» y los péptidos SP16, SP40, SP43, SP46 y SP49 reducen todos los niveles de TNF-alfa más que la dexametasona. Basándose en este barrido de alanina, y sin querer estar limitado por una teoría, parece que los aminoácidos C y N-terminales contribuyen al efecto antiinflamatorio del péptido SP16. Compárese con la figura 4, que muestra un gráfico que resume los niveles de TNF-alfa en el suero en un modelo de inflamación de ratón, por exposición a LPS, tratado con diferentes péptidos derivados de serpiente humana. Se inyectaron a grupos de 3 animales 0,2 mg/kg de péptido y se sometieron a exposición a LPS. Los niveles séricos de TNF-alfa se determinaron mediante ELISA. Varios péptidos proporcionaron el mismo nivel de protección que 1 mg/kg de dexametasona.

La **figura 11** muestra que SP16 es un agonista de TLR2. La gráfica resume los datos representativos de los ensayos con una línea celular indicadora TLR-2 genéticamente modificada (HEK-Blue™ mTLR2, Invivogen). Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de péptido durante 24 horas. Tras la activación de TLR2, las células secretan fosfatasa alcalina que se puede ensayar. El ensayo se realizó por triplicado y se representan gráficamente las medias con las desviaciones estándar. SP16 presentaba propiedades del ligando de TLR-2, induciendo la señalización de TLR-2 de una forma dependiente de la dosis. El péptido de control desordenado SP34 no mostró inducción de TLR2. * $p < 0,05$, comparado con el control desordenado (SP34).

La **figura 12** muestra el análisis de relación de actividad y estructura para SP16. Gráfico que resume los datos de un experimento en el que se usó una línea celular indicadora de TLR-2 genéticamente modificada (HEK-Blue™ mTLR2, Invivogen) para ensayar el impacto de la sustitución de restos de aminoácidos del péptido SP16 por alanina («barrido de alanina»). Las células se incubaron con 20 µg/ml de los péptidos indicados durante 24 horas. Tras la activación de TLR2, las células secretan fosfatasa alcalina que puede ensayar. El ensayo se realizó por triplicado y se representaron gráficamente las medias. Las secuencias de péptidos se muestran en la siguiente figura. * $p < 0,05$, comparado con el control desordenado (SP34).

La **figura 13** muestra el análisis de la relación actividad y estructura para SP16. Tabla que muestra las secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1, 18, 12-17, 52-56 y 51, respectivamente, en orden de aparición) de los péptidos que se ensayaron usando una línea celular indicadora de TLR-2 (véanse los datos en anterior figura). El lado derecho de la tabla resume el impacto de los péptidos en la señalización de TLR-2 (* indica baja, ***** indica alta, N/A no tenía

impacto en la señalización). Los datos sugieren que los primeros tres restos contribuyen a inducir la señalización de TLR-2. Si los restos 1-3 se sustituyen por alaninas (SP37), el péptido mutante no tiene impacto sobre TLR2. Sin embargo, cuando se sustituyen individualmente (SP52-SP54), los péptidos retienen la capacidad de estimular TLR-2. Sorprendentemente, la sustitución del resto de fenilalanina en la posición 3 con un resto de alanina más pequeño 5 potencia la capacidad de estimular la señalización de TLR-2 comparado con SP16.

La **figura 14** muestra un esquema de las diferentes fases de la diabetes tipo II.

La **figura 15** muestra una gráfica que resume los datos de un experimento con sinoviocitos humanos primarios. Las 10 células se incubaron con los péptidos indicados 10 uM, así como 0, 5, 10 o 30 ng/ml de IL1b, durante 48 horas. Tras la estimulación con IL1b, las células secretan la metaloproteasa MMP1, que está implicada en la descomposición del cartílago en la artritis. El ensayo se realizó por triplicado y se representan gráficamente las medias con las desviaciones estándar. SP16 disminuyó la secreción de MMP1 en comparación con los péptidos de control desordenados, con 20 ng/ml de IL1b. (*) indica $p < 0,05$ comparado con el control de péptido desordenado.

15

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0027] La presente descripción describe péptidos aislados usados y útiles en el campo del tratamiento y la prevención de enfermedades. Específicamente, la presente invención proporciona péptidos aislados y/o sintetizados, 20 y análogos sintéticos basados en estos péptidos, como se define en las reivindicaciones, con efectos preventivos y terapéuticos en enfermedades humanas. Por ejemplo, los péptidos se pueden usar para tratar o prevenir la inflamación, la destrucción autoinmune de tejido, p. ej., en el lupus y la enfermedad de injerto contra hospedante, artritis reumatoide, fibrosis quística, eccema, psoriasis y para tratar la diabetes tipo II y tipo I, por ejemplo para estimular el aumento de masa de células beta en un individuo con diabetes, para tratar la enfermedad inflamatoria 25 intestinal así como para tratar o prevenir la endotoxemia después de la exposición a radiación aguda y en pacientes con quemaduras.

[0028] Los péptidos descritos en este documento son péptidos C-terminales cortos, aislados o sintetizados específicamente definidos, basados en serpinas y variantes y derivados de las mismas, con propiedades 30 antiinflamatorias sorprendentemente eficaces y con un tamaño mucho más útil para aplicaciones terapéuticas en comparación con las proteínas serpinas naturales. Los péptidos aislados se muestran en las figuras 1-2. La figura 1 muestra las secuencias de aminoácidos de los fragmentos C-terminales de una variedad de serpinas. Cada péptido está marcado con una SEQ ID NO: en la columna 2, inmediatamente a la izquierda del péptido. La figura 2 muestra los fragmentos C-terminales truncados que se muestran en la figura 1, así como las variantes y derivados de los 35 mismos. De nuevo, cada péptido está marcado con una SEQ ID NO: en la columna 2, inmediatamente al lado del péptido.

[0029] Hemos descubierto que SP16 (SEQ ID NO: 1), que se obtiene de la alfa-antitripsina humana, presenta propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras similares a las de la proteína original, la alfa-1-antitripsina. 40 Parece que SP16 es un interruptor general péptido, el primero en su clase, para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, inflamatorias y metabólicas. Sin querer estar ligado por una teoría, los péptidos de la invención pueden proporcionar un buen perfil de seguridad, basado en el buen perfil de seguridad de la proteína original, la alfa-1-antitripsina. Sin embargo, los péptidos de la invención son mucho más fáciles y, por lo tanto, más baratos de producir, ya que son mucho más pequeños que la proteína original.

45

[0030] Hemos descubierto que los péptidos C-terminales que resultan de la escisión de una molécula serpina por una de sus serina proteasas cognadas tienen una función biológica intrínseca que es distinta de la función 50 inhibidora de la proteasa de la molécula de serpina original completa. Por ejemplo, los péptidos C-terminales de AAT, antiqumotripsina y calistatina tienen grados variables de efectos antiinflamatorios. Basándose en nuestra investigación, sostenemos que estos péptidos antiinflamatorios y/o inmunomoduladores, que son un subproducto del ciclo de vida de una molécula de serpina, representan un tipo de «interruptor general» inmunológico e inflamatorio (homeostático).

[0031] Además, los datos de líneas celulares genéticamente modificadas muestran que SP16 activa la ruta 55 de señalización TLR-2, pero no la señalización de TLR-4. Esto es interesante porque otro péptido inmunomodulador, DiaPep277, que no comparte similitud de secuencia con SP16, tiene un perfil de activación de TLR similar. Sin querer estar limitados por una teoría, basándose en estas observaciones, se sugiere que SP16 actúe a través del receptor TLR2, y posiblemente el receptor de linfocitos T, para conducir la secreción de citoquinas a un perfil de citoquinas antiinflamatorias Th2 (IL-4 e IL-10). En las enfermedades autoinmunitarias, se predice que SP16 induce la

expansión de las poblaciones de linfocitos T reguladoras y de ese modo cambia la respuesta inflamatoria hacia una respuesta reguladora.

[0032] Por lo tanto, se proporcionan nuevas moléculas antiinflamatorias a partir de los péptidos C-terminales de las moléculas de serpina, y nuevas formas de desarrollar moléculas antiinflamatorias adicionales mediante la modificación de los fragmentos C-terminales de serpinas.

[0033] Las funciones previamente conocidas de las serpinas están relacionadas con la inhibición de la función de las enzimas serina proteasa. Algunas serpinas inhiben otros tipos de proteínas, y varias no tienen una función inhibidora.

[0034] Las serpinas son una gran familia (>1000) de inhibidores de serina proteasas que son estructuralmente similares pero funcionalmente diversos. Están implicados en una multitud de procesos fisiológicos y son críticos para la homeostasis en mamíferos. Las mutaciones genéticas en serpinas individuales se ponen de manifiesto en diferentes enfermedades humanas, que incluyen EPOC, trombosis y enfisema.

[0035] Cada serpina con una función inhibidora es responsable de bloquear la actividad de una o más proteínas. Las serpinas se unen a sus proteínas diana para evitar que completen cualquier otra reacción. Tras unirse a un diana, se produce un cambio irreversible en la estructura de una proteína serpina. Algunas células reconocen cuando una serpina se une a su diana y eliminan estas proteínas adheridas del torrente sanguíneo.

[0036] La alfa-1-antitripsina (AAT) es la serpina prototipo. PROLASTIN® (Talecris), ZEMAIRA® (Aventis Behring) y ARALAST® (Baxter) son formulaciones de AAT derivadas de suero humano aprobadas por la FDA para el tratamiento de la EPOC. La AAT se encuentra actualmente en ensayos clínicos para el tratamiento de la diabetes tipo I de nuevo inicio, la enfermedad de injerto contra hospedante y la fibrosis quística.

[0037] Hemos identificado al menos 37 genes de serpinas diferentes en seres humanos. Basándonos en nuestra investigación, sostenemos que los fragmentos C-terminales aislados y sintetizados de las proteínas serpinas proporcionan una nueva fuente de moléculas antiinflamatorias. Por lo tanto, sostenemos que los fragmentos C-terminales de al menos las serpinas citadas en la tabla A son útiles como moléculas antiinflamatorias.

Tabla A		
Símbolo aprobado	Nombre aprobado	Sinónimos
<u>SERPINA1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 1	AAT, A1A, PI1, alfa-1-antitripsina, A1AT, alfa1AT
<u>SERPINA2</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 2	ATR, ARGS
<u>SERPINA3</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 3	ACT, alfa-1-antiquimotripsina
<u>SERPINA4</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 4	KST, KAL, KLST, calistatina
<u>SERPINA5</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 5	PAI3, PROCI
<u>SERPINA6</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 6	
<u>SERPINA7</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 7	
<u>AGT</u>	angiotensinógeno (inhibidor de peptidasa serpina, clado A, miembro 8)	
<u>SERPINA9</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 9	CENTERINA, SERPINA11b, GCET1
<u>SERPINA10</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 10	PZI, ZPI
<u>SERPINA11</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 11	
<u>SERPINA12</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 12	OL-64, Vaspina

Tabla A		
Símbolo aprobado	Nombre aprobado	Sinónimos
<u>SERPINA13</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa, antitripsina), miembro 13 (pseudogén)	UNQ6121
<u>SERPINB1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 1	E1, PI2, anti-elastasa
<u>SERPINB2</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 2	HsT1201
<u>SERPINB3</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 3	T4-A, HsT1196
<u>SERPINB4</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 4	PI11, LEUPIN, SCCA-2, SCCA1
<u>SERPINB5</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 5	maspina
<u>SERPINB6</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 6	PTI, CAP
<u>SERPINB7</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 7	MEGSIN
<u>SERPINB8</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 8	CAP2
<u>SERPINB9</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 9	CAP3
<u>SERPINB10</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 10	bomapina
<u>SERPINB11</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 11 (gen/pseudogén)	EPIPINA
<u>SERPINB12</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 12	YUKOPINA
<u>SERPINB13</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado B (ovoalbúmina), miembro 13	HUR7, hurpin, headpin
<u>SERPINC1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado C (antitrombina), miembro 1	ATIII, mgC22579
<u>SERPIND1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado D (cofactor de heparina), miembro 1	HC-II, HLS2, HC2, D22S673
<u>SERPINE1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado E (nexina, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1), miembro 1	PAI
<u>SERPINE2</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado E (nexina, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1), miembro 2	PN1, GDN, PNI, nexina
<u>SERPINE3</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado E (nexina, inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1), miembro 3	
<u>SERPINF1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado F (alfa-2 antiplasmina, factor derivado del epitelio pigmentario), miembro 1	EPC-1, PIG35
<u>SERPINF2</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado F (alfa-2 antiplasmina, factor derivado del epitelio pigmentario), miembro 2	API, ALFA-2-PI, A2AP, AAP
<u>SERPING1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado G (inhibidor C1), miembro 1	C1IN, C1-INH, HAE1, HAE2
<u>SERPINH1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado H (proteína de choque térmico 47), miembro 1, (proteína de unión a colágeno 1)	HSP47, colligen

Tabla A		
Símbolo aprobado	Nombre aprobado	Sinónimos
<u>SERPINI1</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado I (neuroserpina), miembro 1	neuroserpina
<u>SERPINI2</u>	inhibidor de peptidasa serpina, clado I (pancpina), miembro 2	PANCPIN, TSA2004, MEPI, pancpina

5 [0038] Se llevó a cabo además un barrido de alanina que mostró que los péptidos SP16 modificados aislados o sintetizados que se muestran en la Tabla B a continuación son particularmente eficaces en la reducción de los niveles de TNF-alfa en un modelo de ratón para la inflamación. Específicamente, descubrimos que en estos fragmentos particulares, los tres aminoácidos más N-terminales y los dos más C-terminales parecen tener una función en las propiedades antiinflamatorias de los péptidos, ya que la sustitución de los mismos parece reducir la capacidad de los péptidos para reducir los niveles de TNF-alfa en un modelo de septicemia de ratón con exposición a LPS (figura 10). Por consiguiente, en algunos aspectos descritos en este documento, los péptidos se seleccionan de SP40, SP43, SP46 y SP49 cuyas secuencias peptídicas se exponen en la Tabla B.

10

[0039] La Tabla B muestra que los péptidos llamados SP16; SP40; SP43; SP46; y SP49 proporcionaban un efecto antiinflamatorio particularmente bueno cuando se administraban a un modelo de septicemia de ratón (véase la figura 10).

Tabla B Secuencia de aminoácidos de péptidos

SP16	V K F N K P F V F L M I E Q N T K (SEQ ID NO: 1)
SP37	A A A N K P F V F L M I E Q N T K (SEQ ID NO: 12)
SP40	V K F A A A F V F L M I E Q N T K (SEQ ID NO: 13)
SP43	V K F N K P A A A L M I E Q N T K (SEQ ID NO: 14)
SP46	V K F N K P F V F A A A E Q N T K (SEQ ID NO: 15)
SP49	V K F N K P F V F L M I A A A T K (SEQ ID NO: 16)
SP51	V K F N K P F V F L M I E Q A A A (SEQ ID NO: 17)

15

20 [0040] Según los aspectos descritos en este documento, cualquiera de los péptidos aislados que consisten en o consisten esencialmente en las secuencias expuestas en las SEQ ID NO: 8, 10, 19-34 y 38-49 se pueden usar para reducir la inflamación. Cualquiera de los péptidos que consiste en o consiste esencialmente en las secuencias expuestas en SEQ ID NOs: 8, 10, 19-34 y 38-49 también se puede usar para reducir el TNF- α en un sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de TNF- α en el suero se reduce hasta 50 % o más o 75 % o más en comparación con la cantidad del mismo en el suero antes de administrar el péptido.

25 [0041] La Tabla C a continuación presenta péptidos ilustrativos adicionales que se usaron para reducir los niveles de TNF-alfa en ratones sometidos a una exposición a LPS. Véase también la figura 10B. También se contemplan los péptidos con capacidad para reducir los niveles de TNF-alfa como se muestra en la figura 10B para las composiciones, composiciones farmacéuticas y procedimientos de uso y tratamiento de afecciones inflamatorias como se describe en este documento.

30 Tabla C. (SEQ ID NO: 18-32, 1 y 33-34, respectivamente, en orden de aparición)

Tabla C (SEQ ID NO: 18-32, 1 y 33-34, respectivamente, en orden de aparición)

SP1	AAT C36 humana Humana	S I P P E	V K F N K P F V F L M I E Q N T K S P L F M G K V V N P T Q K
SP2	Calistatina (C39) Humana	S A Q T N	R H I L R F N R P F L V V I F S T S T Q S V L F L G K V V D P T K P
SP3	Antiquimiotripsina (C40)	S A L V E T R T I	V R F N R P F L M I I V P T D T Q N I F F M S K V T N P K Q A
SP4	Serpina3M de rata (C38)	S G R P P M	I V W F N R P F L I A V S H T H G Q T I L F M A K V I N P V G A
SP5	Serpina3K de rata (C38)	K S L P Q T I P L L N F N R P F M L V I	T D D N G Q S V F F M G K V T N P M
SP6	Híbrido humano 1	S A Q V E T	I V R F N R P F L V I I V S T N T Q
SP7	Humano-rata Híbrido 1	S I P P Q M	I V W F N R P F L I A I S H T H T Q
SP8	AAT C36 humana Humana	S I P P E	V K F N K P F V F L M I E Q N T K
SP9	Calistatina (C39) Humana	S A Q T N	R H I L R F N R P F L V V I F S T S T Q
SP10	Antiquimiotripsina (C40)	S A L V E T R T I	V R F N R P F L M I I V P T D T Q
SP11	Serpina3K de rata	K S L P Q T I P L L N F N R P F M L V I	T D D N G Q

Tabla C (SEQ ID NO: 18-32, 1 y 33-34, respectivamente, en orden de aparición)

	(C38)		
SP12	AAT C36 humana Humana	I P P E	V K F N K P F V F L M I E Q N T K
SP13	Calistatina (C39) Humana	N R H I L R F N R P F L V V I F S T S T Q	
SP14	Antiquimiotripsina (C40)	T R T I V R F N R P F L M I I V P T D T Q	
SP15	Serpina3K de rata (C38)	T I P L L N F N R P F M L V I	T D D N G Q
SP16	Secuencia núcleo C36, larga		V K F N K P F V F L M I E Q N T K
SP17	Secuencia núcleo C36, corta		V K F N K P F V F L M
SP18	AAT C36 humana	S I P P E	V K A A A A A F L M I E Q N T K

[0042] SP1 (SEQ ID NO: 18); SP2 (SEQ ID NO: 19); SP3 (SEQ ID NO: 20); SP4 (SEQ ID NO: 21); SP5 (SEQ ID NO: 22); SP6 (SEQ ID NO: 23); SP7 (SEQ ID NO: 24); SP8 (SEQ ID NO: 25); SP9 (SEQ ID NO: 26); SP10 (SEQ ID NO: 27); SP11 (SEQ ID NO: 28); SP12 (SEQ ID NO: 29); SP13 (SEQ ID NO: 30); SP14 (SEQ ID NO: 31); SP15 (SEQ ID NO: 32); SP16 (SEQ ID NO: 1); SP17 (SEQ ID NO: 33); SP18 (SEQ ID NO: 34).

[0043] La frase «que consiste esencialmente en» en este documento pretende definir el alcance de los péptidos a los aminoácidos del material especificado, y para incluir solo aminoácidos adicionales o cambios que no afecten materialmente a las características básicas y nuevas de la invención reivindicada, en concreto, la capacidad antiinflamatoria de los péptidos cortos aislados o sintetizados. La definición excluye específicamente los péptidos que tienen una secuencia de una proteína serpina completa, y la definición también excluye específicamente las

secuencias peptídicas que son iguales o mayores que 37 aminoácidos de cualquier proteína serpina de origen natural.

[0044] Sin desear estar ligados por una teoría, también hemos identificado los aminoácidos importantes que proporcionan el núcleo, y las posibles modificaciones, para un péptido antiinflamatorio como se fabrica en este documento. Por lo tanto, también se proporcionan los péptidos aislados abarcados por las fórmulas que se exponen a continuación y se pueden usar para reducir la inflamación.

[0045] Se sabe que la AAT humana, la antiqumotripsina y la calistatina contienen elementos con propiedades antiinflamatorias. Sin embargo, estos elementos no se han identificado previamente. Ahora hemos establecido una nueva familia de péptidos derivados de serpina humana con potente efecto antiinflamatorio usando, p. ej., un modelo de endotoxemia de ratón (endotoxemia inducida por LPS). Basándose en la eficacia de los péptidos en el modelo de inflamación de ratón, el tamaño del péptido y el perfil de seguridad de la proteína parental, los péptidos basados en AAT, los péptidos, tales como SP16, y fragmentos y derivados de los mismos proporcionan una molécula nueva y mejorada para tratar la inflamación en humanos.

[0046] La fórmula I describe en este documento una composición que comprende un péptido que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos X1-Z1-F-N-R -P-F-X2-Z2-X3-Z3-Q (SEQ ID NO: 35) y X1-Z1-F-N-K -P-F-X2-Z2-X3-Z3 (SEQ ID NO: 2) en la que

20 X1 es V o L;
 X2 es V, L o M;
 X3 es M, I o V;
 Z1 es cualquier aminoácido;
 25 Z2 es una secuencia de cualesquiera dos aminoácidos; y
 Z3 es una secuencia de cualesquiera cinco aminoácidos, en donde el péptido comprende 37 o menos aminoácidos.

[0047] En algunos aspectos de la descripción, el péptido aislado produce una disminución de 50 % o 75 % en los niveles de TNF- α en el suero en comparación con el nivel en el suero medido antes de administrar el péptido aislado, cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, el péptido comprende además una proteína de fusión. La proteína de fusión se puede seleccionar de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida o una combinación de los mismos.

[0048] En algunos aspectos de la descripción, el péptido aislado produce una mejora en el control glucémico en sujetos diabéticos, medido usando, p. ej., la prueba de A1C, prueba de glucosa en plasma en ayunas (FPG), y/o la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Los individuos prediabéticos típicamente obtienen una puntuación igual o superior a 5,7 % a por debajo de 6,5 % en la prueba de A1C, mientras que los diabéticos obtienen una puntuación por encima de 6,5 % en esta prueba. Los individuos prediabéticos típicamente también obtienen una puntuación de o por encima de 100 mg/dl a por debajo de 126 mg/dl usando la prueba FPG mientras que los diabéticos obtienen una puntuación por encima de 126 mg/dl. Los individuos prediabéticos típicamente obtienen una puntuación de o por encima de 140 a por debajo de 200 mg/dl usando la prueba OGTT mientras que los individuos diabéticos obtienen una puntuación por encima de 200 mg/dl.

[0049] La fórmula II descrita en este documento proporciona una composición que comprende un péptido aislado que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en la secuencia de aminoácidos X1-Z1-F-N-X2-P-F-X3-Z2-X4-Z3-X5 (SEQ ID NO: 3), en la que

50 X1 es V o L;
 X2 es K o R;
 X3 es V, L o M;
 X4 es M, I o V;
 X5 es K o Q;
 Z1 es cualquier aminoácido;
 Z2 es una secuencia de cualesquiera dos aminoácidos;
 55 Z3 es una secuencia de cualesquiera cinco aminoácidos; y en la que el péptido aislado produce una disminución de 75 % en los niveles de TNF- α en el suero en comparación con los niveles en el suero antes de administrar el péptido aislado cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano.

[0050] El péptido que comprende la secuencia de aminoácidos de X1-Z1-F-N-X2-P-F-X3-Z2-X4-Z3-X5 (SEQ

ID NO: 3) como se ha definido anteriormente, incluye, como máximo, 35, 22 o 21 restos de aminoácidos. En algunos aspectos descritos en este documento, el péptido comprende además una proteína de fusión. Específicamente, la proteína de fusión se puede seleccionar de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida o una combinación de los mismos.

5

[0051] En algunos aspectos de todos los procedimientos y usos de la descripción, el péptido es SP16.

[0052] Por lo tanto, la descripción también proporciona un péptido aislado que consiste en o consiste esencialmente en la secuencia de aminoácidos RFNRPFLR (SEQ ID NO: 4) y RFNKPFLR (SEQ ID NO: 5), que también se puede usar para el tratamiento de la inflamación. El péptido provoca una disminución de 50 % o 75 % en los niveles en el suero de TNF- α en comparación con los niveles en el suero de TNF- α antes de administrar el péptido aislado cuando se administra en una cantidad eficaz a un sujeto humano. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la descripción, el péptido aislado comprende además una proteína de fusión. Específicamente, la proteína de fusión se puede seleccionar de un marcador de epítipo y un prolongador de la semivida. El péptido aislado de la descripción comprende, como máximo, 100, 35, 22, 21, 16 o 9 aminos. El péptido aislado comprende la secuencia de aminoácidos de Z1-RFNRPFLR-Z2 (SEQ ID NO: 6) y Z1-RFNKPFLR-Z2 (SEQ ID NO: 7) en las que Z1 y Z2 son independientemente entre 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos.

[0053] En algunos aspectos de la descripción, el péptido aislado consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de RRRFNRPFLRRR (SEQ ID NO: 8) y RRRFNKPFLRRR (SEQ ID NO: 9). La descripción también proporciona una composición que comprende un péptido que consiste esencialmente en, o que consiste en, la secuencia de aminoácidos de FNRPFLL (SEQ ID NO: 10) y FNKPFL (SEQ ID NO: 11).

[0054] El péptido aislado de la descripción comprende 5 o más aminoácidos secuenciales de la secuencia de aminoácidos de FLMIEQNTK (SEQ ID NO: 36). Estos péptidos se pueden usar para reducir la inflamación o reducir el nivel de TNF- α en un sujeto. En algunas realizaciones, la cantidad de nivel de TNF- α en el suero se reduce en comparación con la cantidad de TNF- α en el suero antes de administrar el péptido aislado. El control glucémico mejora, medido usando pruebas, tales como la prueba de A1C, prueba de glucosa plasmática en ayunas (FPG) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Además, tanto el nivel de TNF- α como el control glucémico se pueden usar al medir la mejoría en un individuo diabético.

[0055] En algunos aspectos, el procedimiento de tratamiento de la inflamación comprende además el análisis de los niveles en el suero de TNF- α antes de administrar el péptido aislado y después de administrar el péptido aislado. Si el nivel en el suero de TNF- α disminuye menos de 30 %, la etapa de administración se puede repetir con la misma dosis o con una dosis mayor del péptido en comparación con la primera dosis.

[0056] Los fragmentos de cualquiera de los péptidos descritos anteriormente pueden variar en tamaño. Por ejemplo, estos fragmentos pueden ser de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 o 37, aminoácidos de longitud.

[0057] Los péptidos descritos anteriormente se usan generalmente para reducir la inflamación. Los péptidos ejercen efectos antiinflamatorios e inmunomoduladores y, adicionalmente, estimulan directa o indirectamente la regeneración de las células beta. En algunas realizaciones, estos péptidos reducen la inflamación reduciendo la actividad o expresión del TNF- α . La actividad del TNF- α se puede reducir 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 %. La expresión de TNF- α se puede reducir 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 99 o 100 %. Cuando se administra terapéuticamente, la composición peptídica normalmente comprende además una solución o vehículo farmacéuticamente aceptable.

[0058] Los péptidos descritos anteriormente también se pueden usar para tratar, prevenir o mejorar los síntomas de varias patologías. Estas patologías incluyen inflamación, destrucción de tejido autoinmune e hiperglucemia. Los péptidos descritos anteriormente también se pueden usar para estimular el aumento de la masa de células beta en un individuo con diabetes, en el tratamiento de la fibrosis quística y en el tratamiento o prevención de la endotoxemia después de la exposición a la radiación aguda y en pacientes quemados.

55

[0059] Por consiguiente, la descripción proporciona además procedimientos para tratar la inflamación que comprende la etapa de administrar cualquiera de los péptidos descritos en este documento o una combinación de los mismos, a un sujeto que necesita tratamiento para la inflamación. En algunos aspectos, el sujeto no se ha tratado con alfa-antitripsina antes del tratamiento. En algunos aspectos, el procedimiento comprende una etapa de

ensayar si el individuo tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero, y si el sujeto tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero entonces administrar el péptido al sujeto, y si no, entonces no administrar el péptido al sujeto.

5 **[0060]** La descripción también permite procedimientos para prevenir el desarrollo de inflamación, que comprenden la etapa de administrar uno cualquiera de los péptidos o una combinación de los mismos a un sujeto que necesita prevención para la inflamación. En algunos aspectos, el sujeto no se ha tratado con alfa-antitripsina antes del tratamiento. En algunos aspectos, el procedimiento comprende una etapa de ensayar si el individuo tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero, y si el sujeto tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero, entonces administrar el péptido al sujeto, y si no, entonces no administrar el péptido al sujeto.

10 **[0061]** La descripción también permite procedimientos para prevenir la destrucción de tejido autoinmune, que comprenden la etapa de administrar uno cualquiera de los péptidos o una combinación de los mismos a un sujeto que necesita prevenir la destrucción de tejido autoinmune. En algunos aspectos, el sujeto no se ha tratado con alfa-antitripsina antes del tratamiento. En algunos aspectos, el procedimiento comprende una etapa de ensayar si el
15 individuo tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero, y si el sujeto tiene niveles aumentados de TNF- α en el suero, entonces administrar el péptido al sujeto, y si no, entonces no administrar el péptido al sujeto.

[0062] La descripción también permite procedimientos para mejorar el control glucémico en individuos que tienen diabetes, que comprenden la etapa de administrar cualquiera de los péptidos o una combinación de los
20 mismos a un sujeto que necesita prevenir la destrucción del tejido autoinmune. En algunos aspectos, el sujeto no ha sido tratado con alfa-antitripsina antes del tratamiento. En algunos aspectos, el procedimiento comprende una etapa de ensayar si el individuo ha mejorado el control glucémico p. ej., mediante una prueba de A1C, prueba de glucosa en plasma en ayunas y/o la prueba de tolerancia oral a la glucosa o cualquier otra prueba conocida para medir el funcionamiento del control glucémico.

25 **[0063]** La descripción proporciona el uso de uno cualquiera o una combinación de los péptidos aislados o sintetizados para el tratamiento de la inflamación, y la inflamación en la que aumenta el nivel de TNF- α .

[0064] En algunos aspectos de la descripción, la inflamación está relacionada con la diabetes tipo 1 o 2, la
30 artritis reumatoide o la EPOC.

[0065] La descripción también proporciona procedimientos para el tratamiento y la prevención de la fibrosis quística y la endotoxemia después de la exposición a radiación aguda y en pacientes quemados, que usan uno
35 cualquiera o una combinación de los péptidos de la invención.

[0066] Por conveniencia, ciertos términos usados en toda la solicitud (que incluye la memoria descriptiva, los ejemplos y las reivindicaciones adjuntas) se definen a lo largo de la memoria descriptiva. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que
40 entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención.

[0067] El término «tipo natural» se refiere a la secuencia de polinucleótidos que se encuentra de forma natural, que codifica una proteína, o una parte de la misma, o una secuencia de proteína, o una parte de la misma, respectivamente, como normalmente existe in vivo.

45 **[0068]** El término «mutante» se refiere a cualquier cambio en el material genético de un organismo, en particular un cambio (es decir, eliminación, sustitución, adición o alteración) en una secuencia de polinucleótido de tipo natural o cualquier cambio en una secuencia de proteína de tipo natural. Aunque a menudo se supone que un cambio en el material genético produce un cambio en la función de la proteína, el término «mutante» se refiere a un cambio en la secuencia de una proteína de tipo natural independientemente de si ese cambio altera la función de la
50 proteína (por ejemplo, aumenta, disminuye, imparte una nueva función), o si ese cambio no tiene ningún efecto sobre la función de la proteína (por ejemplo, la mutación o variación es silenciosa). El término mutación se usa de forma intercambiable en este documento con polimorfismo en esta solicitud.

[0069] Los términos «polipéptido» y «proteína» se usan de forma intercambiable para referirse a un polímero
55 aislado de restos de aminoácidos, y no se limitan a una longitud mínima a menos que se defina de otra manera. Los péptidos, oligopéptidos, dímeros, multímeros y similares también están compuestos por aminoácidos dispuestos de forma lineal unidos por enlaces peptídicos, y ya sean producidos biológicamente y aislados del entorno natural, producidos usando tecnología recombinante o producidos de forma sintética típicamente usando aminoácidos naturales.

[0070] El polipéptido o proteína de la descripción es un «polipéptido modificado» que comprende aminoácidos que no se encuentran de forma natural. En algunos aspectos, los polipéptidos comprenden una combinación de aminoácidos naturales y que no se encuentran de forma natural y, en algunas realizaciones, los péptidos comprenden solo aminoácidos que no se encuentran de forma natural.

[0071] En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, los péptidos o péptidos modificados comprenden además modificaciones cotraduccionales y postraduccionales (escisión del péptido C-terminal), tales como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, acetilación, fosforilación, escisión proteolítica (p. ej., escisión por furinas o metaloproteasas) y similares, en la medida en que tales modificaciones no afecten a las propiedades antiinflamatorias de los péptidos aislados o a su capacidad para mejorar el control glucémico.

[0072] En algunos aspectos descritos en este documento, el polipéptido está alterado. El término «polipéptido alterado» se refiere a un péptido que incluye alteraciones, tales como eliminaciones, adiciones y sustituciones (en general de naturaleza conservadora como conocería un experto en la materia, tales como alaninas), en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada, es decir, su actividad antiinflamatoria o capacidad para mejorar el control glucémico o reducir la hiperglucemia. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tal como por mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tal como a través de mutaciones de hospedantes artificiales, como bacterias modificadas genéticamente, levaduras o células de mamíferos, que producen las proteínas o errores debido a la amplificación por PCR u otros procedimientos de ADN recombinantes. Los polipéptidos o proteínas están compuestos por aminoácidos dispuestos linealmente unidos por enlaces peptídicos, pero, a diferencia de los péptidos, tienen una conformación bien definida. Las proteínas, a diferencia de los péptidos, generalmente consisten en cadenas de 50 o más aminoácidos.

[0073] El término «péptido», como se usa en este documento, se refiere típicamente a una secuencia de aminoácidos compuesta por una sola cadena de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. En general, los péptidos contienen al menos dos restos de aminoácidos y tienen menos de aproximadamente 50 aminoácidos de longitud, a menos que se desvíen de otra manera.

[0074] El «péptido modificado» puede incluir la incorporación de aminoácidos no naturales en los péptidos de la invención, incluyendo aminoácidos no naturales sintéticos, aminoácidos sustituidos o son convenientes uno o más D-aminoácidos en los péptidos (u otros componentes de la composición, con excepción de las secuencias de reconocimiento de proteasas) en determinadas situaciones. Los péptidos que contienen D-aminoácidos presentan mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo* en comparación con las formas que contienen L-aminoácidos. Por lo tanto, la construcción de péptidos que incorporan D-aminoácidos puede ser particularmente útil cuando se desea o se requiere mayor estabilidad *in vivo* o intracelular. Más específicamente, los D-péptidos son resistentes a peptidasas y proteasas endógenas, proporcionando así un mejor suministro oral transepitelial y transdérmico de fármacos y conjugados unidos, biodisponibilidad mejorada de complejos permanentes de membrana (véase más adelante para una discusión más detallada), y tiempos de vida intravascular e intersticial prolongados cuando dichas propiedades son deseables. El uso de péptidos del isómero D también puede potenciar el suministro transdérmico y transepitelial oral de fármacos unidos y otras moléculas de carga. Además, los péptidos D no pueden ser procesados de manera eficaz para la presentación restringida del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II a linfocitos T auxiliares, y, por lo tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en el organismo completo. Los conjugados peptídicos se pueden construir, por lo tanto, usando, por ejemplo, formas de isómero D de secuencias peptídicas de penetración celular, formas de isómero L de sitios de escisión y formas de isómero D de péptidos terapéuticos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los péptidos como se describen comprenden aminoácidos L y D, en los que no se incluyen más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 D-aminoácidos. En algunos aspectos, los péptidos comprenden más de 10 D-aminoácidos y, en algunos aspectos, todos los aminoácidos de los péptidos son D-aminoácidos.

[0075] Los péptidos o fragmentos o derivados de los mismos de la descripción pueden ser «péptidos retroinvertidos». Un «péptido retroinvertido» se refiere a un péptido con una inversión de la dirección del enlace peptídico en al menos una posición, es decir, una inversión de los extremos amino y carboxi con respecto a la cadena lateral del aminoácido. Por lo tanto, un análogo retroinvertido ha invertido los extremos y ha invertido la dirección de los enlaces peptídicos mientras que mantiene aproximadamente la topología de las cadenas laterales como en la secuencia del péptido natural. El péptido retroinvertido puede contener L-aminoácidos o D-aminoácidos, o una mezcla de L-aminoácidos y D-aminoácidos, hasta que todos los aminoácidos sean el isómero D. Los análogos peptídicos retroinvertidos parciales son polipéptidos en los que solo se invierte parte de la secuencia y se reemplaza con restos de aminoácidos enantioméricos. Dado que la parte retroinversa de dicho análogo tiene extremos amino y

carboxilo invertidos, los restos de aminoácidos que flanquean la parte retroinvertida se reemplazan por diaminometanos y malonatos geminales α -sustituidos de cadenas laterales análogas, respectivamente. Se ha descubierto que las formas retroinvertidas de los péptidos que penetran en las células funcionan tan eficientemente en la translocación a través de una membrana como las formas naturales. Las síntesis de análogos peptídicos retroinvertidos se describen en Bonelli, F. y col., *Int J Pept Protein Res.* 24 (6): 553 - 6 (1984); Verdini, A y Viscomi, G. C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*: 697-701 (1985); y patente de EE.UU. n.º 6.261.569. Se han descrito los procedimientos para la síntesis en fase sólida de análogos peptídicos retroinvertidos parciales (documento EP 97994-B).

10 **[0076]** Los términos «homología», «identidad» y «similitud» se refieren al grado de similitud de secuencia entre dos péptidos o entre dos moléculas de ácido nucleico alineadas de forma óptima. La homología y la identidad pueden determinarse cada una comparando una posición en cada secuencia que puede alinearse para fines de comparación. Por ejemplo, se basa en el uso de un software de homología estándar en la posición predeterminada, como BLAST, versión 2.2.14. Cuando una posición equivalente en las secuencias comparadas está ocupada por la misma base o aminoácido, entonces las moléculas son idénticas en esa posición; cuando el sitio equivalente está ocupado por restos de aminoácidos similares (p. ej., similar en naturaleza estérica y/o electrónica tal como, por ejemplo, sustituciones de aminoácidos conservadoras), entonces las moléculas pueden denominarse homólogas (similares) en esa posición. La expresión como un porcentaje de homología/similitud o identidad se refiere a una función del número de aminoácidos similares o idénticos en posiciones compartidas por las secuencias comparadas, respectivamente. Una secuencia que «no está relacionada» o «no es homóloga» comparte menos del 40 % de identidad, aunque preferiblemente menos del 25 % de identidad con las secuencias como se describe en este documento.

25 **[0077]** Como se usa en este documento, la expresión «identidad de secuencia» significa que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos son idénticas (es decir, basándose en nucleótido por nucleótido o resto por resto) a lo largo de la ventana de comparación. La expresión «porcentaje de identidad de secuencia» se calcula comparando dos secuencias alineadas de forma óptima a lo largo de la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se encuentra la misma base de ácido nucleico (p. ej., A, T, C, G, U o I) o resto en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de ventana) y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

35 **[0078]** La expresión «identidad sustancial» como se usa en este documento indica una característica de una secuencia de polinucleótido o aminoácidos, donde el polinucleótido o aminoácidos comprende una secuencia que tiene al menos 85 % de identidad de secuencia, preferiblemente al menos 90 % a 95 % de identidad de secuencia, más habitualmente al menos 99 % de identidad de secuencia en comparación con una secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente a lo largo de una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en donde el porcentaje de identidad de secuencia se calcula comparando la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir eliminaciones o adiciones que totalizan 20 por ciento o menos de la secuencia de referencia a lo largo la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia mayor. El término «similitud», cuando se usa para describir un polipéptido, se determina comparando la secuencia de aminoácidos y los sustitutos de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido.

45 **[0079]** Como se usa en el presente documento, los términos «homología» u «homólogos» se usan de forma intercambiable, y cuando se usan para describir un polinucleótido o polipéptido, indican que dos polinucleótidos o polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean de forma óptima y se comparan, por ejemplo usando BLAST, la versión 2.2.14 con parámetros por defecto para un alineamiento (véase en este documento), son idénticos, con inserciones o eliminaciones de nucleótidos o inserciones o eliminaciones de aminoácidos adecuados, en al menos 70 % de los nucleótidos, habitualmente de aproximadamente 75 % a 99 %, y más preferiblemente al menos aproximadamente de 98 a 99 % de los nucleótidos. El término «homología» u «homólogo» como se usa en el este documento también se refiere a la homología con respecto a la estructura y/o función. Con respecto a la homología de secuencia, las secuencias son homólogas si son al menos 50 %, al menos 60 al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 %, al menos 95 % idénticas, al menos 97 % idénticas, o al menos 55 99 % idénticas. La determinación de homólogos de los genes o péptidos de la presente invención la puede determinar fácilmente el experto en la técnica.

[0080] La expresión «sustancialmente homólogas» se refiere a secuencias que son al menos 90 %, al menos 95 % idénticas, al menos 96 %, idénticas al menos 97 % idénticas, al menos 98 % idénticas o al menos 99 %

idénticas. Las secuencias homólogas pueden ser el mismo gen funcional en diferentes especies. La determinación de homólogos de los genes o péptidos de la presente invención la puede realizar fácilmente el experto en la técnica.

[0081] Para la comparación de secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de ensayo. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de ensayo y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencias, si es necesario, y se designan los parámetros del programa de algoritmo de secuencia. El algoritmo de comparación de secuencia calcula entonces el porcentaje de identidad de secuencia para la(s) secuencia(s) de ensayo con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros de programa designados.

[0082] La alineación óptima de las secuencias para la comparación se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (*Adv. Appl. Math.* 2: 482 (1981)), por el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (*J. Mol. Biol.* 48: 443-53 (1970)), por el procedimiento de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444-48 (1988)), por implementaciones computarizadas de estos algoritmos (p. ej. GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el paquete de software Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wes.), o por inspección visual. (Véase en general Ausubel y col. (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, 4ª ed., John Wiley and Sons, Nueva York (1999)).

[0083] Un ejemplo de un algoritmo útil es PILEUP. PILEUP crea una alineación de secuencias múltiple a partir de un grupo de secuencias relacionadas usando alineaciones progresivas por pares para mostrar el porcentaje de identidad de secuencia. También representa gráficamente un árbol o un dendrograma que muestra las relaciones de agrupamiento usadas para crear la alineación. PILEUP usa una simplificación del procedimiento de alineación progresiva de Feng y Doolittle (*J. Mol. Evol.* 25: 351 - 60 (1987)). El procedimiento usado es similar al procedimiento descrito por Higgins y Sharp (*Comput. Appl. Biosci.* 5: 151-53 (1989)). El programa puede alinear hasta 300 secuencias, cada una de una longitud máxima de 5.000 nucleótidos o aminoácidos. El procedimiento de alineación múltiple comienza con la alineación por parejas de las dos secuencias más similares, produciendo un grupo de dos secuencias alineadas. Este grupo después se alinea con la siguiente secuencia más relacionada o grupo de secuencias alineadas. Dos grupos de secuencias se alinean mediante una extensión simple de la alineación por parejas de dos secuencias individuales. La alineación final se logra mediante una serie de alineamientos progresivos por pares. El programa se ejecuta designando secuencias específicas y sus coordenadas de aminoácidos o nucleótidos para regiones de comparación de secuencias y designando los parámetros del programa. Por ejemplo, una secuencia de referencia se puede comparar con otras secuencias de ensayo para determinar la relación de porcentaje de identidad de secuencia usando los siguientes parámetros: peso de hueco por defecto (3,00), peso de longitud de hueco por defecto (0,10) y huecos de extremo ponderados.

[0084] Otro ejemplo de un algoritmo que es adecuado para determinar el porcentaje de identidad de secuencia y la similitud de secuencia es el algoritmo BLAST, que describen Altschul y col. (*J. Mol. Biol.* 215: 403 - 410 (1990)). (Véase también Zhang y col., *Nucleic Acid Res.* 26: 3986-90 (1998)); Altschul y col., *Nucleic Acid Res.* 25: 3389 - 402 (1997)). El software para realizar análisis BLAST está disponible públicamente a través del sitio web de información del Centro Nacional de Biotecnología. Este algoritmo implica identificar primero pares de secuencias de puntuación alta (HSP) identificando palabras cortas de longitud W en la secuencia de consulta, que coinciden o satisfacen alguna puntuación umbral de valor positivo T cuando se alinean con una palabra de la misma longitud en una secuencia de base de datos. T se denomina el umbral de puntuación de palabra vecina (Altschul y col., (1990), véase antes). Estos aciertos de palabras vecinales iniciales actúan como semillas para iniciar búsquedas para encontrar HSP más largas que las contienen. Los aciertos de palabras se extienden después en ambas direcciones a lo largo de cada secuencia hasta donde se pueda aumentar la puntuación de alineación acumulada. La extensión de los aciertos de palabras en cada dirección se detiene cuando: la puntuación de alineación acumulada cae en la cantidad X desde su valor máximo alcanzado; la puntuación acumulada va a cero o menos, debido a la acumulación de uno o más alineamientos de restos de puntuación negativa; o se llega al final de cualquiera de las secuencias. Los parámetros del algoritmo BLAST W, T y X determinan la sensibilidad y la velocidad de la alineación. El programa BLAST usa por defecto una longitud de palabra (W) de 11, la matriz de puntuación BLOSUM62 (véase Henikoff y Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10915 - 9 (1992)) alineaciones (B) de 50, expectativa (E) de 10, M = 5, N = 4, y una comparación de ambas cadenas.

[0085] Además de calcular el porcentaje de identidad de secuencia, el algoritmo BLAST también realiza un análisis estadístico de la similitud entre dos secuencias (véase, p. ej. Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 5873-77 (1993)). Una medida de similitud proporcionada por el algoritmo BLAST es la probabilidad de suma más pequeña (P(N)), que proporciona una indicación de la probabilidad por la cual una coincidencia entre dos secuencias

de nucleótidos o aminoácidos ocurriría por casualidad. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos se considera similar a una secuencia de aminoácidos de referencia si la probabilidad de suma más pequeña en una comparación del aminoácido de ensayo con el aminoácido de referencia es menor que aproximadamente 0,1, más típicamente menor que aproximadamente 0,01, y lo más típicamente menor de aproximadamente 0,001.

5

[0086] El término «variante» como se usa en este documento se refiere a un péptido o ácido nucleico que difiere del polipéptido o ácido nucleico por una o más eliminaciones, adiciones, sustituciones o modificaciones de la cadena lateral de aminoácidos o ácidos nucleicos, pero retiene una o más funciones específicas o actividades biológicas de la molécula que se encuentra de forma natural. Las sustituciones de aminoácidos incluyen alteraciones en las que un aminoácido se sustituye por un resto de aminoácido diferente que se encuentra de forma natural o no convencional. Dichas sustituciones pueden clasificarse como «conservadoras», en cuyo caso un resto de aminoácido contenido en un polipéptido se sustituye por otro aminoácido que se encuentra de forma natural de carácter similar, ya sea en relación con la polaridad, la funcionalidad de la cadena lateral o el tamaño. Dichas sustituciones conservadoras son bien conocidas en la técnica. Las sustituciones abarcadas por la presente descripción también pueden ser «no conservadoras», en las que un resto de aminoácido que está presente en un péptido se sustituye por un aminoácido que tiene propiedades diferentes, tal como un aminoácido que se encuentra de forma natural de un grupo diferente (p. ej., sustituyendo un aminoácido cargado o hidrofóbico por alanina), o alternativamente, en el que un aminoácido que se encuentra de forma natural se sustituye por un aminoácido no convencional. Las sustituciones de aminoácidos son conservadoras. También está abarcado dentro del término variante cuando se usa con referencia a un polinucleótido o polipéptido, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que puede variar en estructura primaria, secundaria o terciaria, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente (por ejemplo, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo natural).

[0087] Las variantes también pueden ser polinucleótidos o polipéptidos sintéticos, recombinantes o químicamente modificados, aislados o generados usando procedimientos bien conocidos en la materia. Las variantes pueden incluir cambios de aminoácidos conservadores o no conservadores, como se describe a continuación. Los cambios de polinucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, eliminaciones, fusiones y truncamientos de aminoácidos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Las variantes también pueden incluir inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos, incluyendo inserciones y sustituciones de aminoácidos y otras moléculas) que normalmente no se encuentran en la secuencia peptídica que es la base de la variante, por ejemplo, pero sin limitarse a, la inserción de ornitina, que normalmente no ocurre en las proteínas humanas. El término «sustitución conservadora», cuando se describe un polipéptido, se refiere a un cambio en la composición de aminoácidos del polipéptido que no altera sustancialmente la actividad del polipéptido. Por ejemplo, una sustitución conservadora se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente que tiene propiedades químicas similares. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen la sustitución de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina.

[0088] Las «sustituciones de aminoácidos conservadoras» resultan de reemplazar un aminoácido por otro que tiene propiedades estructurales y/o químicas similares, tal como el reemplazo de una leucina por una isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato o una treonina por una serina. Por tanto, una «sustitución conservadora» de una secuencia de aminoácidos particular se refiere a la sustitución de aquellos aminoácidos que no son críticos para la actividad del polipéptido o la sustitución de aminoácidos por otros aminoácidos que tienen propiedades similares (p. ej., ácidos, básicos, carga positiva o negativa, polares o no polar, etc.) de modo que la sustitución de incluso los aminoácidos críticos no reduce la actividad del péptido (es decir, la capacidad del péptido para penetrar en la barrera hematoencefálica (BBB)). Las tablas de sustituciones conservadoras que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los siguientes seis grupos contiene cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí: 1) alanina (A), serina (S), treonina (T); 2) ácido aspártico (D), ácido glutámico (E); 3) asparagina (N), glutamina (Q); 4) arginina (R), lisina (K); 5) isoleucina (I), leucina (L), metionina (M), valina (V); y 6) fenilalanina (F), tirosina (Y), triptófano (W). (Véase también Creighton, *Proteins*, W. H. Freeman and Company (1984)). Las sustituciones, eliminaciones o adiciones individuales que alteran, añaden o eliminan un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos también pueden considerarse «sustituciones conservadoras» si el cambio no reduce la actividad del péptido. Las inserciones o eliminaciones están típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La elección de aminoácidos conservadores se puede seleccionar basándose en la ubicación del aminoácido que se va a sustituir en el péptido, por ejemplo, si el aminoácido está en el exterior del péptido y se expone a disolventes, o en el interior y no está expuesto a disolventes.

[0089] Se puede seleccionar el aminoácido que sustituirá un aminoácido existente basándose en la ubicación del aminoácido existente, es decir, su exposición a disolventes (es decir, si el aminoácido está expuesto a

disolventes o está presente en la superficie externa del péptido o polipéptido en comparación con aminoácidos localizados internamente no expuestos a disolventes). La selección de dichas sustituciones de aminoácidos conservadoras es bien conocida en la técnica, por ejemplo, como describen Dordo y col., *J. Mol Biol*, 1999, 217, 721-739. y Taylor y col., *J. Theor. Biol.* 119 (1986); 205-218 y S. French y B. Robson, *J. Mol. Evol.* 19 (1983)171. Por consiguiente, se pueden seleccionar sustituciones conservadoras de aminoácidos adecuadas para aminoácidos en el exterior de una proteína o péptido (es decir, aminoácidos expuestos a un disolvente), por ejemplo, pero sin limitación, se pueden usar las siguientes sustituciones: sustitución de Y por F, T por S o K, P por A, E por D o Q, N por D o G, R por K, G por N o A, T por S o K, D por N o E, I por L o V, F por Y, S por T o A, R por K, G por N o A, K por R, A por S, K o P.

10

[0090] También se pueden seleccionar sustituciones de aminoácidos conservadoras que abarcan aminoácidos adecuados en el interior de una proteína o péptido, por ejemplo, se pueden usar sustituciones conservadoras adecuadas para aminoácidos en el interior de una proteína o péptido (es decir, los aminoácidos no están expuestos a un disolvente), por ejemplo pero no limitado a, se pueden usar las siguientes sustituciones conservadoras: donde Y se sustituye por F, T por A o S, I por L o V, W por Y, M por L, N por D, G por A, T por A o S, D por N, I por L o V, F por Y o L, S por A o T y A por S, G, T o V. En algunas realizaciones, las sustituciones de aminoácidos no conservadoras también están abarcadas dentro del término de variantes.

[0091] El término «derivado» como se usa en este documento se refiere a péptidos que se han modificado químicamente, por ejemplo, pero no limitados a, mediante técnicas, tales como ubiquitinación, marcaje, pegilación (derivatización con polietilenglicol), lipidación, glucosilación o adición de otras moléculas. Una molécula también es un «derivado» de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc. de las moléculas. Los restos pueden alternativamente disminuir la toxicidad de la molécula, eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar tales efectos se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, A.R. Gennaro, Ed., MackPubl., Easton, PA (1990).

[0092] Por lo tanto, en algunos aspectos descritos en este documento, los péptidos de la invención comprenden derivados peptídicos, tales como péptidos pegilados.

30

[0093] El término «funcional» cuando se usa junto con «derivado» o «variante» se refiere a un péptido que posee una actividad biológica (funcional o estructural), que es sustancialmente similar a una actividad biológica de la entidad o molécula, es un derivado funcional o una variante funcional de la misma, es decir, actividad antiinflamatoria en el contexto de los péptidos descritos en este documento. El término derivado funcional se pretende que incluya los fragmentos, análogos o derivados químicos de una molécula.

[0094] El término «inserciones» o «eliminaciones» están típicamente en el intervalo de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos. La variación permitida se puede determinar experimentalmente produciendo el péptido sintéticamente mientras se hacen inserciones, eliminaciones o sustituciones de nucleótidos sistemáticamente en la secuencia usando técnicas de ADN recombinante.

40

[0095] El término «sustitución» cuando se refiere a un péptido, se refiere a un cambio en un aminoácido por una entidad diferente, por ejemplo, otro aminoácido o resto de aminoácido. Las sustituciones pueden ser sustituciones conservadoras o no conservadoras.

45

[0096] Un «análogo» de una molécula tal como un péptido se refiere a una molécula de función similar a la molécula completa o a un fragmento de la misma. El término «análogo» también pretende incluir especies alélicas y variantes inducidas. Los análogos típicamente difieren de los péptidos de origen natural en una o pocas posiciones, a menudo en virtud de sustituciones conservadoras. Los análogos típicamente presentan al menos 80 o 90 % de identidad de secuencia con péptidos naturales. Algunos análogos también incluyen aminoácidos no naturales o modificaciones de aminoácidos N o C-terminales. Los ejemplos de aminoácidos no naturales son, por ejemplo, pero no limitados a; aminoácidos disustituídos, N-alquilaminoácidos, ácido láctico, 4-hidroxi prolina, γ -carboxiglutamato, ϵ -N, N,N-trimetilisina, ϵ -N-acetilsina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3 -metilhistidina, 5-hidroxisina, σ -N-metilarginina. Los fragmentos y análogos pueden cribarse para determinar su eficacia profiláctica o terapéutica en modelos de animales transgénicos como se describe más adelante.

50

[0097] Por «unido covalentemente» se entiende unido directa o indirectamente (p. ej., a través de un conector) mediante un enlace químico covalente. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, los péptidos de fusión están unidos covalentemente.

[0098] El término «proteína de fusión» como se usa en el presente documento se refiere a una proteína recombinante de dos o más proteínas. Las proteínas de fusión se pueden producir, por ejemplo, mediante una secuencia de ácido nucleico que codifica una proteína que se une al ácido nucleico que codifica otra proteína de manera que constituyen un único marco de lectura abierto que se puede traducir en las células en un único polipéptido que alberga todas las proteínas pretendidas. El orden de disposición de las proteínas puede variar. Las proteínas de fusión pueden incluir un marcador de epítipo o un prolongador de la semivida. Los marcadores de epítipo incluyen biotina, marcador FLAG, c-myc, hemaglutinina, His6 (SEQ ID NO: 37), digoxigenina, FITC, Cy3, Cy5, proteína fluorescente verde, marcadores de epítipo V5, GST, β -galactosidasa, AU1, AU5 y avidina. Los prolongadores de semivida incluyen dominio Fc y albúmina sérica.

[0099] Los términos «sujeto» e «individuo» y «paciente» se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a un animal, por ejemplo, un animal humano o no humano (p. ej., un mamífero), para el que se proporciona el tratamiento, incluido el tratamiento profiláctico, con una composición farmacéutica como se describe en este documento. El término «sujeto» como se usa en el presente documento se refiere a animales humanos y no humanos. La expresión «animales no humanos» incluye todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos (en particular primates superiores), ovejas, perros, roedores (p. ej., ratones o ratas), cobayas, cabras, cerdos, gatos, conejos, vacas y no mamíferos, tales como pollos, anfibios, reptiles, etc. En una realización, el sujeto es humano. En otra realización, el sujeto es un sustituto animal o animal experimental como modelo de enfermedad. Los mamíferos no humanos incluyen mamíferos, tales como primates no humanos, (en particular primates superiores), ovejas, perros, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobayas, cabras, cerdos, gatos, conejos y vacas. En algunos aspectos, el animal no humano es un animal de compañía, como un perro o un gato.

[0100] «Tratar» una enfermedad o afección en un sujeto o «tratar» a un paciente que tiene una enfermedad o afección se refiere a someter al individuo a un tratamiento farmacéutico, p. ej., la administración de un medicamento, de modo que al menos uno de los síntomas de la enfermedad o afección disminuye o se estabiliza. Típicamente, cuando el péptido se administra terapéuticamente como un tratamiento, se administra a un sujeto que presenta uno o más síntomas de inflamación.

[0101] El término «prevención» se usa en relación con la prevención de los síntomas o la ralentización del desarrollo de los síntomas desde el momento del estado asintomático. Típicamente, cuando el péptido se administra preventivamente, se administra a un sujeto que no presenta síntomas inminentes de inflamación. Típicamente, el sujeto corre el riesgo de desarrollar inflamación, tal como diabetes o EPOC, debido a los antecedentes familiares, resultados de laboratorio, pruebas genéticas o el estilo de vida. En algunos aspectos, la «prevención» se refiere a la administración de péptidos a víctimas de quemaduras o personas que han sido expuestas a radiación aguda antes de desarrollar endotoxemia debido a que estos sujetos están en riesgo de desarrollar endotoxemia como resultado del daño tisular causado por una quemadura o radiación.

[0102] Por «se une específicamente» o «unión específica» se entiende un compuesto o anticuerpo que reconoce y se une a un polipéptido deseado pero que no reconoce ni se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra, por ejemplo, una muestra biológica, que incluye de forma natural un polipéptido de la invención. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o menor. La constante de disociación es al menos aproximadamente 1×10^{-7} M, 1×10^{-8} M, o 1×10^{-9} M. Los procedimientos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis en equilibrio, resonancia de plasmón superficial, y similares.

[0103] Por «aislado» se entiende que el polipéptido se ha separado de cualquier entorno natural, tal como un fluido corporal, p. ej., sangre, y separado de los componentes que acompañan de forma natural al péptido.

[0104] Por aislado y «sustancialmente puro» se entiende un polipéptido que se ha separado y purificado hasta al menos determinado grado de los componentes que lo acompañan de forma natural. Típicamente, un polipéptido es sustancialmente puro cuando está al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, o incluso al menos aproximadamente 99 %, en peso, exento de las proteínas y moléculas orgánicas naturales con las que se asocia de forma natural. Por ejemplo, se puede obtener un polipéptido sustancialmente puro por extracción de una fuente natural, por expresión de un ácido nucleico recombinante en una célula que normalmente no expresa esa proteína, o por síntesis química.

[0105] Por una «disminución» o «inhibición» usado en el contexto del nivel de, por ejemplo, los niveles de

TNF-alfa, se refiere a la reducción de la cantidad de proteína en la muestra biológica, tal como muestra de sangre o tejido, una célula, un extracto celular o un líquido sobrenadante celular. Por ejemplo, dicha disminución puede deberse a una menor estabilidad, transcripción o traducción de ARN, a una mayor degradación de proteína o a una interferencia de ARN. Preferiblemente, esta disminución es al menos aproximadamente 5 %, al menos 5 aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, o incluso al menos aproximadamente 90 % en comparación con un valor de referencia.

[0106] La expresión «valor de referencia» en el contexto de las reivindicaciones y la solicitud se refiere típicamente a un nivel anormalmente alto de TNF-alfa encontrado en un individuo afectado por o que padece inflamación. El valor de referencia es típicamente la cantidad de TNF-alfa en el individuo antes de la administración del péptido de la invención. En algunos aspectos de todas las realizaciones relacionadas con el control glucémico, el término «valor de referencia» se refiere a los valores numéricos usados en la medición del control glucémico en un sujeto. Hay una serie de ensayos que se pueden usar para determinar si, por ejemplo, un sujeto humano está afectado por prediabetes. Dichos ensayos incluyen, por ejemplo, la prueba de A1C, prueba de glucosa en plasma en ayunas (FPG) y prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). A continuación, se dan ejemplos de valores de referencia que usan estos procedimientos: los individuos prediabéticos típicamente tienen una puntuación igual o superior a 5,7 % a por debajo de 6,5 % en la prueba A1C, mientras que los diabéticos tienen una puntuación mayor de 6,5 % en esta prueba. Los individuos prediabéticos típicamente también suelen tener una puntuación de o más de 100 mg/dl a por debajo de 126 mg/dl usando la prueba FPG, mientras que los diabéticos tienen una puntuación de más de 126 mg/dl. Los individuos prediabéticos típicamente tienen una puntuación de o mayor de 140 a menos de 200 mg/dl usando la prueba OGTT mientras que los individuos diabéticos tienen una puntuación de más de 200 mg/dl. Por lo tanto, en referencia a un valor de referencia normoglucémico, se pueden usar los siguientes números de corte cuando se realiza la medición usando las pruebas mencionadas anteriormente: prueba de A1C - por debajo de 5,7 %; prueba FPG por debajo de 100 mg/dl; y OGTT bajo 140 mg/dl.

[0107] Por un «aumento» en la expresión o actividad de un gen o proteína se entiende un cambio positivo en el nivel o actividad de proteína o ácido nucleico en una célula, un extracto celular o un líquido sobrenadante celular. Por ejemplo, dicho aumento puede deberse a una mayor estabilidad, transcripción o traducción del ARN, o a una disminución de la degradación de la proteína. Preferiblemente, este aumento es al menos 5 %, al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 200 %, o incluso aproximadamente 500 % o más sobre el nivel de expresión o actividad bajo condiciones de control.

[0108] El término «recombinante» como se usa en el presente documento para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, vírico, semisintético y/o sintético, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con todos o una parte del polinucleótido con el que está asociado en la naturaleza. El término recombinante como se usa con respecto a una proteína o polipéptido, significa un polipéptido producido por expresión de un polinucleótido recombinante. El término recombinante como se usa con respecto a una célula hospedante significa una célula hospedante en la que se ha introducido un polinucleótido recombinante. Recombinante también se usa en este documento para referirse a, con referencia a material (p. ej., una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector), que el material se ha modificado mediante la introducción de un material heterólogo (p. ej., una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector).

[0109] El término «vectores» se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al que se ha unido; un plásmido es una especie del género abarcado por «vector». El término «vector» típicamente se refiere a una secuencia de ácido nucleico que contiene un origen de replicación y otras entidades necesarias para la replicación y/o mantenimiento en una célula hospedante. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes y/o la secuencia de ácido nucleico a la que están operativamente unidos se denominan en este documento «vectores de expresión». En general, los vectores de expresión de utilidad a menudo están en forma de «plásmidos» que se refieren a bucles circulares de ADN bicatenario que, en su forma de vector, no están unidos al cromosoma, y típicamente comprenden entidades para expresión estable o transitoria o el ADN codificado. Se pueden usar otros vectores de expresión en los procedimientos descritos en este documento, pero no se limitan a, plásmidos, episomas, cromosomas artificiales bacterianos, cromosomas artificiales de levadura, bacteriófagos o vectores víricos, y dichos vectores pueden integrarse en el genoma del hospedante o replicarse de forma autónoma en célula particular. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. También se pueden usar otras formas de vectores de expresión conocidos por los expertos en la materia que sirven para funciones equivalentes, por ejemplo, vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en un genoma de hospedante. Los

vectores preferidos son aquellos capaces de replicación autónoma y/o expresión de ácidos nucleicos a los que están unidos. Los vectores capaces de dirigir la expresión de los genes a los que están operativamente unidos se denominan en este documento «vectores de expresión».

5 **[0110]** El término «vectores víricos» se refiere al uso de virus, o vectores asociados a virus como portadores de una construcción de ácido nucleico en una célula. Las construcciones se pueden integrar y empaquetar en genomas víricos defectuosos y no replicantes, como adenovirus, virus adenoasociado (AAV) o virus herpes simplex (HSV) u otros, incluyendo los vectores retrovíricos y lentivíricos, para infección o transducción en células. El vector puede o no estar incorporado en el genoma de la célula. Las construcciones pueden incluir secuencias víricas para
10 la transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción se puede incorporar en vectores capaces de replicación episomal, p. ej., vectores EPV y EBV.

[0111] Los artículos «un» y «una» se usan en este documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, «un elemento» significa un elemento o más de un
15 elemento. Excepto en los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción usados en este documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término «aproximadamente». El término «aproximadamente» cuando se usa en relación con porcentajes puede significar +1 %. La presente invención se explica adicionalmente en detalle mediante los siguientes ejemplos. El alcance está definido por las reivindicaciones solamente.
20

Procedimientos de tratamiento

[0112] Un aspecto de la presente descripción se refiere al uso de péptidos descritos en este documento y mutantes, variantes, análogos o derivados de los mismos. Los procedimientos descritos en este documento se
25 refieren a la administración de uno cualquiera de los péptidos como se describen en este documento, o sus modificaciones farmacéuticamente aceptables, en un vehículo farmacéuticamente aceptable a un sujeto, por ejemplo, un mamífero que lo necesite, p. ej., un ser humano, es decir, un sujeto que tiene inflamación o destrucción del tejido autoinmunitaria o un individuo con hiperglucemia o control glucémico alterado, tal como un individuo con diabetes tipo 2, y que necesita proteger y/o estimular el aumento de la masa de células beta, o un individuo
30 diagnosticado de fibrosis quística, o un individuo en riesgo alto de desarrollar endotoxemia como resultado de quemaduras o exposición a la radiación aguda. También proporcionamos tratamiento contra el lupus y la enfermedad del injerto contra huésped, uveítis, eccema, psoriasis, EII y la diabetes tipo I de inicio reciente.

[0113] Las descripciones clínicas de estas enfermedades son bien conocidas. En algunos aspectos, primero
35 se diagnostica al ser humano que tiene uno o más síntomas de la enfermedad antes de administrar uno o más de los péptidos de la invención. En algunas realizaciones, al ser humano no se le ha administrado previamente AAT como tratamiento para los síntomas.

[0114] Por ejemplo, hemos mostrado en modelos de ratones preclínicos consolidados para enfermedades
40 humanas que incluyen la diabetes tipo II (db/db), artritis reumatoide (CAIA) y endotoxemia letal que, por ejemplo, el péptido SP16 mejora significativamente los síntomas.

[0115] También proporcionamos evidencia de que, p. ej., el péptido SP16 puede administrarse de forma
45 segura usando estudios de seguridad preclínicos bien establecidos. Por ejemplo, también hemos demostrado usando el ensayo FastPatch que, por ejemplo, el péptido SP16 no afecta a la actividad de hERG y tampoco hemos podido identificar ningún impacto en el estudio de selección por pasos de receptores humanos (GenSEP Explorer) para el péptido SP16.

[0116] Los ratones db/db llevan un receptor de leptina defectuoso que afecta su capacidad para regular el
50 apetito y el metabolismo. Los animales se vuelven obesos a las 3-4 semanas de edad, y al principio muestran resistencia a la insulina que es seguida por hiperglucemia aproximadamente a las 4-8 semanas de edad. La hiperglucemia grave es paralela al agotamiento de los linfocitos B productores de insulina de los islotes pancreáticos y la muerte a los 10 meses de edad.

55 **[0117]** Los animales db/db son modelo las diferentes fases de la diabetes tipo II en seres humanos (figura 14). Hemos demostrado que los péptidos de la invención proporcionan beneficios en etapas tempranas y tardías de la enfermedad. Por ejemplo, hemos demostrado que SP 16 mejora el control glucémico en el modelo db/db.

[0118] Los niveles de glucosa en sangre y HbA1c mostraron que el tratamiento con SP16 reduce la

hiperglucemia y mejora el control glucémico. En este estudio, se asignaron ratones db/db prediabéticos de cinco semanas de edad a grupos de 10. Los grupos recibieron solución salina (control de vehículo), 0,6 mg/kg de SP16 dos veces por semana o 25 mg/kg de rosiglitazona dos veces por semana. Los niveles de glucosa en sangre no en ayunas se determinaron dos veces por semana usando un glucómetro. Los niveles de HbA1c se determinaron usando el monitor «A1cNow». Los valores representan promedios para cada grupo. (**) indica $p < 0,01$ y (*) indica $p < 0,05$ en comparación con el grupo de control del vehículo (prueba T). Véase, la figura 8A. También se sabe que el valor de normalización objetivo para los pacientes con diabetes humana también es cierto para el ratón normal, estableciendo así los resultados del modelo de ratón directamente relevantes para la diabetes tipo II humana.

10 **[0119]** Las figuras 8B y 8D ilustran una gráfica que resume los niveles séricos de péptido C (8B) e hiperplasia de islotes (8D) en el modelo de ratón db/db de diabetes tipo II. Los mayores niveles de péptido C en el suero son consistentes con la función mejorada de las células β en los grupos tratados. Se asignaron ratones db/db prediabéticos de cinco semanas de edad a grupos de 10. Los grupos recibieron solución salina (simulado), 0,6 mg/kg de SP16 o 25 mg/kg de rosiglitazona dos veces por semana. Se determinaron los niveles combinados de péptido C sérico para cada grupo. (*) Indica $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ en comparación con el control de vehículo.

20 **[0120]** Los autores de la invención también mostraron que el SP16 reducía los niveles de CRP en el suero en comparación con un control de vehículo (figura 8E). Los menores niveles de CRP son consistentes con una menor inflamación en el grupo de ratones tratados con SP16. De forma similar, los mayores niveles de TGF-beta en ratones tratados con SP16 son consistentes con el tratamiento con péptido que promueve un perfil de citoquinas antiinflamatorias (figura 8F). Se asignaron ratones db/db diabéticos de ocho semanas de edad a 8 grupos. Los grupos recibieron solución salina (simulado) o 0,6 mg/kg de SP16 dos veces por semana durante 12 semanas. Se determinaron los niveles combinados de CRP y TGF-beta en el suero para cada grupo. (*) indica $p < 0,05$ y (**) $p < 0,01$ en comparación con el grupo de control de vehículo.

25 **[0121]** El modelo preclínico de CAIA de artritis reumatoide es un estudio breve en el que se induce la artritis en ratones Balb/c. El día 0, a los animales se les inyecta por vía intravenosa un cóctel de anticuerpos contra colágeno (MD BioSciences) que inicia la destrucción autoinmunitaria del colágeno en sus articulaciones. El día 3, se usa una inyección intraperitoneal de LPS para exacerbar la reacción autoinmunitaria y la inflamación. La lectura en este modelo es la hinchazón de la pata y la evaluación histológica de la erosión articular. La enfermedad generalmente comienza a disminuir después de 7-10 días.

30 **[0122]** Demostramos que SP16 muestra eficacia en el modelo de ratón CAIA preclínico. Específicamente, se midieron las puntuaciones de hinchazón acumulada para todas las patas en el pico de la enfermedad (día 7) para grupos de 5 animales. Se inyectó por vía IV a ratones Balb/c un cóctel de anticuerpos contra colágeno (MD BioSciences) el día 0 y se les inyectó IP con LPS el día 3. Los animales de control normal no recibieron inyecciones y sirvieron como control de valores iniciales libre de enfermedad. La inyección diaria de SP16 de 12 $\mu\text{g}/\text{día}$ proporcionó una protección equivalente a la dexametasona y las inyecciones de 12 μg una vez cada 3 días redujeron la inflamación en casi un 50 % en comparación con el tratamiento con el control de vehículo. Véase por ej., la figura 9.

40 **[0123]** También mostramos que SP16 disminuye la secreción de metaloproteína-1 de la matriz (MMP-1) en un ensayo basado en células que refleja los resultados del modelo de CAIA vivo para la artritis reumatoide. Las células se incubaron con 10 μM de los péptidos indicados, así como 0, 5, 10 o 30 ng/ml de IL1 β , durante 48 horas. Tras la estimulación con IL1 β , las células secretan la metaloproteasa MMP1, que está implicada en la descomposición de la matriz extracelular en la artritis. El ensayo se realizó por triplicado y se representan gráficamente las medias con las desviaciones estándar. SP16 disminuyó la secreción de MMP1 en comparación con los péptidos de control desordenados, con 20 ng/ml de IL1 β . (*) indica $p < 0,05$ en comparación con el control de péptido desordenado. Véase por ej., la figura 15.

50 **[0124]** Usamos el modelo de endotoxemia letal como predictor de protección contra la septicemia durante el síndrome de radiación aguda. El lipopolisacárido (LPS) es una endotoxina purificada a partir de bacterias Gram negativas. En los animales, el LPS provoca una fuerte respuesta inmunitaria como se pone de manifiesto por el aumento de los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias y la letalidad en dosis altas. En el síndrome de radiación aguda, las bacterias Gram negativas que se escapan del sistema GI contribuyen a un síndrome de respuesta inflamatoria sistémica y letalidad. En el modelo animal, el péptido se administró en el tiempo $T = -2$ horas, $T = 0$ horas o $T = 0,5$ horas. LPS se inyectó en $T = 0$ horas. Mostramos que SP16 aumenta la supervivencia en la endotoxemia letal lo que les permite extrapolar que el péptido proporcionaría tratamiento a víctimas humanas de quemaduras o en el síndrome de radiación aguda humana. Se inyectaron grupos de 10 animales como se ha

indicado, 2 horas antes, en el momento de, y/o 0,5 horas después de la inducción de la endotoxemia letal. La endotoxemia se indujo por la inyección de 15 mg/kg de LPS. La supervivencia se controló en los tiempos de medición de 4, 8, 24, 28, 32, 48, 52, 56 y 72 horas (figura 7).

5 **[0125]** Por lo tanto, en un aspecto proporcionamos procedimientos para el tratamiento de diabetes tipo II, artritis reumatoide y endotoxemia causada por quemaduras y/o radiación, que comprenden administrar a un sujeto humano que lo necesite una composición que comprende al menos uno de los péptidos de la invención. En algunos aspectos, el péptido comprende SP16.

10 **[0126]** Demostramos que los péptidos de la invención, por ejemplo, SP16, son agonistas del receptor 2 similar a toll. Por consiguiente, sin desear estar ligados por una teoría, los péptidos, tales como SP16, actúan como un fármaco antiinflamatorio promoviendo un perfil de citoquinas antiinflamatorio. Además, sin desear estar ligados por una teoría, los péptidos, tales como SP16, también pueden actuar como moduladores inmunes al inducir la expansión de linfocitos T reguladoras tolerogénicas y protectoras (T-regs). Además, sin desear estar ligados a una
15 teoría, los péptidos, tales como SP16, también pueden regular por disminución las respuestas autoinmunitarias sin inducir una supresión inmunológica general, proporcionando así un tratamiento superior para las enfermedades autoinmunitarias en comparación con la mayoría de los tratamientos actualmente disponibles que generalmente suprimen la sistema inmunitario exponiendo a los individuos tratados a un riesgo de infecciones mientras reciben tratamiento con inmunosupresores generales.

20 **[0127]** Como los péptidos derivan de AAT, y en vista de los resultados en modelos *in vivo* e *in vitro*, es razonable esperar que la mayoría de los efectos terapéuticos de AAT se apliquen también a los péptidos de la invención, tales como SP16. Específicamente, se ha demostrado que AAT modula la proliferación de linfocitos T y la activación de NF-kappa-B; altera la interacción de la célula NK con el objetivo; inhibe la activación de las serina
25 proteasas de la señalización EGFR/TLR-4 de las células epiteliales; está implicado en la expresión génica inducida por TNF-alfa y la apoptosis o células endoteliales; previene la hemólisis de los glóbulos rojos por *E. coli*, disminuye el recuento de células eosinófilas de la circulación; inhibe la quimiotaxis de neutrófilos, NADHP oxidasa y señalización ANCA; inhibe la liberación de citoquinas de monocitos y macrófagos y la regulación de la expresión de CD14, e inhibe la liberación de histamina en los mastocitos; y modula la proliferación de linfocitos B y la producción de
30 citoquinas.

[0128] Por lo tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan procedimientos para modular la proliferación de linfocitos T y la activación de NF-kappa-B; alterar la interacción de la célula NK diana; inhibir la activación de serina proteasas de la señalización EGFR/TLR-4 de células epiteliales; modular la expresión génica inducida por
35 TNF-alfa y apoptosis o células endoteliales; prevenir la hemólisis de glóbulos rojos por *E. coli*, disminuir el recuento de células eosinófilas en la circulación; inhibir la quimiotaxis de neutrófilos, NADHP oxidasa y señalización ANCA; inhibir la liberación de citoquinas de monocitos y macrófagos y la regulación de la expresión de CD14, e inhibir la liberación de histamina de mastocitos; y modular la proliferación de linfocitos B y la producción de citoquinas, que comprenden la etapa de administrar a un sujeto humano una composición que comprende al menos uno de los
40 péptidos de la invención. En algunos aspectos, el péptido es SP16, que puede comprender una o más modificaciones realizadas típicamente para potenciar la biodisponibilidad y/o la vida en anaquel del péptido, tales como la pegilación y similares.

[0129] También se ha llevado a cabo un ensayo de optimización de péptidos usando un barrido de alanina
45 con el ensayo TLR-2. Los datos se obtuvieron usando un experimento con una línea celular indicadora de TLR-2 genéticamente modificada (HEK-BLUE™ mTLR2, Invivogen). Las células se incubaron con los 20 µg/ml de los péptidos indicados durante 24 horas. Tras la activación de TLR2, las células secretan fosfatasa alcalina que se puede analizar. El ensayo se realizó por triplicado y se representan gráficamente las medias. El péptido SP34 es un control de péptido desordenado (amarillo) y PAM (Pam3CSK4; rojo) es un control positivo. Véase, por ejemplo, la
50 figura 12.

[0130] La siguiente tabla proporciona los resultados de un ensayo para el perfil farmacocinético de SP16.

Parámetros PK	SP16, IV (5 mg/kg)
C0 (µg/ml)	2,5
AUC hasta la última muestra (µg-h/ml)	0,9
t1/2 (h)	1,9
CL total (ml/h)	140

CL total (ml/min/kg)	9,7
Último tiempo de medición	8,0
MRTINF (h)	1,1
V (ml)	374
Vss (ml)	149

[0131] Cuando se llevó a cabo el ensayo, se inyectaron a tres ratas normales por vía intravenosa 5 mg/kg de SP16 y se estableció la concentración plasmática de SP16 en 8 tiempos de medición después de la inyección. Para cada tiempo de medición, los niveles de SP16 se determinaron por LC/MS/MS y los valores se usaron para calcular la $C_{máx}$ (2,5 $\mu\text{g/ml}$) y $T_{1/2}$ (1,9 horas). El ensayo fue ejecutado por Apredica, Boston, MA. Por consiguiente, se determinó que SP16 tiene una semivida de 1,9 horas en ratas normales.

[0132] El perfil de seguridad de SP16 también incluía datos de hERG. El ensayo de hERG FastPatch mostró que SP16 no inhibe hERG en dosis de hasta 25 μM . Estos datos predicen que SP16 no tendrá problemas de seguridad cardíaca en seres humanos. El estudio fue realizado por Apredica, Boston, MA.

ID del cliente	Conc. de ensayo (μM)	Valor CI_{50} (μM)	comentario
SP16	0,008-25	>25	No se observó inhibición dependiente de la concentración.
Quinidina	0,01-10	1,8	control positivo

ID del cliente	% de actividad media							Comentarios
	μM	0,008 μM	0,04 μM	0,2 μM	1 μM	5 μM	25 μM	
SP16	100	89	95	95	78	88	89	No se observó inhibición dependiente de la concentración.

[0133] Además, también se realizó un perfil usando el cribado por pasos de receptores humanos. El panel GenSEP Explorer contiene 111 objetivos de ensayo *in vitro* cuidadosamente seleccionados para evaluar las actividades biológicas de fármacos/productos químicos. Las categorías de ensayo incluyen GPCR, canales iónicos regulados por voltaje, canales iónicos regulados por ligando, transportadores de neurotransmisores, receptores nucleares y esteroides, así como un conjunto diverso de objetivos bioquímicos que incluyen fosfodiesterasas, quinasas y otras enzimas relevantes. El estudio fue ejecutado por Caliper LifeSciences, y los resultados se resumen en la tabla a continuación. Parece que SP16 no tiene efecto sobre 111 receptores humanos, lo que indica que SP16 tiene un excelente perfil de seguridad humana.

Clase de receptor	Número de receptores	Porcentaje de inhibición
Relacionado con neurotransmisores	47	Insignificante
Esteroides	4	Insignificante
Canales iónicos	8	Insignificante
Factores de crecimiento y hormonas	2	Insignificante
Segundos mensajeros	3	Insignificante
Péptidos de cerebro/intestino	15	Insignificante
Enzimas	20	Insignificante
Enzimas, quinasas	11	Insignificante
Basado en células, funcional	1	Insignificante

[0134] En vista del perfil de seguridad de SP16, se puede extrapolar razonablemente que los otros fragmentos peptídicos proporcionados en este documento también serían seguros para administrar al ser humano.

[0135] En una realización, los procedimientos de tratamiento descritos en este documento comprenden además la selección o el diagnóstico de un sujeto que tiene cualquiera de las afecciones descritas anteriormente, p. ej., una que surge de la inflamación antes de administrar un péptido como se describe en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado del mismo, para así tratar la afección o disfunción, tal como inflamación. Dicha

selección la lleva a cabo el experto en la materia mediante una serie de procedimientos disponibles, por ejemplo, evaluación de los síntomas que se describen en este documento. Por ejemplo, se puede evaluar la cantidad de TNF-alfa en el sujeto para determinar la cantidad de inflamación presente en el sujeto. En el caso de la diabetes, se puede medir el control glucémico usando niveles de glucosa en sangre bien definidos. En algunos aspectos de todas las realizaciones descritas en este documento, los péptidos se pueden administrar a individuos con una etapa prediabética para prevenir el desarrollo de diabetes tipo 2. Hay una serie de pruebas que se pueden usar para determinar si, p. ej., un sujeto humano está afectado por prediabetes. Dichas pruebas incluyen, p. ej., la prueba de A1C, prueba de glucosa plasmática en ayunas (FPG) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Los individuos prediabéticos generalmente tienen una puntuación de o superior a 5,7 % a inferior a 6,5 % en la prueba A1C, mientras que los diabéticos tienen una puntuación superior a 6,5 % en esta prueba. Los individuos prediabéticos también tienen una puntuación típicamente de o superior a 100 mg/dl a inferior a 126 mg/dl usando la prueba FPG, mientras que los diabéticos tienen una puntuación superior a 126 mg/dl. Los individuos prediabéticos típicamente tienen una puntuación de o superior a 140 a inferior a 200 mg/dl usando la prueba OGTT mientras que los individuos diabéticos tienen una puntuación superior a 200 mg/dl. Por lo tanto, un procedimiento para prevenir la diabetes según la presente descripción puede comprender administrar el péptido a un individuo al que se le ha diagnosticado previamente prediabetes, p. ej., usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente. En algunos aspectos, el procedimiento comprende identificar la diabetes tipo 2 en el sujeto y después administrar el péptido sintético de la invención al sujeto.

[0136] En algunos aspectos de todas las realizaciones, se puede usar la proteína C reactiva como un marcador para la inflamación o eficacia del tratamiento. La proteína C reactiva (CRP) se usa para detectar la inflamación si existe una gran sospecha de daño tisular o infección en algún lugar del cuerpo. La CRP sirve como un marcador general para la infección y la inflamación y se puede usar para evaluar en un individuo una afección inflamatoria aguda o crónica. Una cantidad alta o creciente de CRP en la sangre sugiere la presencia de inflamación. En individuos sospechosos de tener una infección bacteriana grave, una CRP alta sugiere la presencia de una. En personas con afecciones inflamatorias crónicas, los niveles altos de CRP sugieren un brote o que el tratamiento no ha sido eficaz. La concentración normal en el suero en seres humanos sanos normalmente es inferior a 10 mg/l, aumentando ligeramente con el envejecimiento. Se encuentran niveles más altos en mujeres embarazadas tardías, inflamación leve e infecciones víricas (10-40 mg/l), inflamación activa, infección bacteriana (40-200 mg/l), infecciones bacterianas graves y quemaduras (>200 mg/l). En algunos aspectos, la expresión «valor de referencia» se refiere a las mediciones de CRP cuando la CRP se usa como prueba de diagnóstico de inflamación.

[0137] En algunos aspectos, el sujeto puede tener una mutación genética diagnosticada, tal como cuando se diagnostica al sujeto fibrosis quística (FQ). La FQ es una enfermedad autosómica recesiva causada por mutaciones en el gen de la proteína reguladora de conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR). En algunos aspectos, la descripción proporciona un procedimiento para identificar primero una mutación que causa FQ en el sujeto y después administrar el péptido sintético de la invención al sujeto. Actualmente, se han comunicado 1913 mutaciones a la base de datos de FQ disponible públicamente mantenida por Cystic Fibrosis Center en el Hospital for Sick Children en Toronto, Canadá. A menudo, la prueba se usa para analizar las mutaciones más comunes, tales como $\Delta F508$. Los antecedentes familiares y el origen étnico pueden proporcionar pistas sobre los tipos de mutaciones que se pueden detectar en un niño afectado. El diagnóstico de FQ también puede incluir la detección de piel de sabor salado, poco crecimiento y poca ganancia de peso a pesar de una ingesta de alimentos normal, acumulación de moco espeso y pegajoso, infecciones frecuentes de pecho y tos o dificultad para respirar. Los varones pueden ser infértiles debido a la ausencia congénita de los conductos deferentes. Los síntomas a menudo aparecen en la infancia y la niñez, tales como la obstrucción intestinal debido al íleo meconial en los bebés recién nacidos. A medida que los niños crecen, deben hacer ejercicio para liberar moco en los alvéolos. Las células epiteliales ciliadas en el paciente tienen una proteína mutada que conduce a la producción de moco anormalmente viscoso.

[0138] En algunos aspectos, se diagnostican quemaduras al sujeto y, por lo tanto, un riesgo alto de desarrollar endotoxemia relacionada con la quemadura, y, posteriormente, se pueden administrar los péptidos de la invención al sujeto para evitar el desarrollo de endotoxemia. En algunos aspectos, la víctima de quemaduras no tiene ni ha sido tratada de afecciones inflamatorias, diabetes, EPOC o FQ. En algunos aspectos, el sujeto se ha expuesto a radiación y tiene lesión por radiación aguda, y, posteriormente, se pueden administrar los péptidos de la presente invención al sujeto para evitar el desarrollo de endotoxemia. En algunos aspectos, el sujeto tiene signos o síntomas de endotoxemia y los péptidos de la invención también se pueden administrar a dicho sujeto. Después de la exposición a la radiación ionizante, si la dosis es suficientemente alta, las bacterias Gram negativas se escapan del sistema gastrointestinal y pueden causar endotoxemia (septicemia). Se ha mostrado que los péptidos mejoran la supervivencia durante la endotoxemia letal inducida en un modelo de ratón. Por lo tanto, basándose en estos

resultados se puede concluir que los péptidos también se pueden usar en seres humanos que están en riesgo de una afección similar, en concreto, endotoxemia o septicemia como resultado de quemaduras o exposición aguda a la radiación.

5 **[0139]** El tratamiento satisfactorio o eficaz se pone de manifiesto por la mejora de uno o más síntomas de la afección o disfunción como se describe en este documento. Se espera que la administración de un péptido como se describe en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado del mismo a un sujeto que lo necesite, evite o retarde el desarrollo de las afecciones y disfunciones físicas descritas en este documento (p. ej., las que surgen de inflamación o destrucción de tejido autoinmunitaria o una afección mejorada por estimulación del aumento de la
10 masa de células beta en un individuo con diabetes). El término «prevención» se usa para referirse a una situación en la que un sujeto aún no tiene la afección específica que se va a prevenir, lo que significa que no se ha manifestado en ninguna forma apreciable. La prevención abarca la prevención o la ralentización del inicio y/o la gravedad de un síntoma (incluso cuando el sujeto ya tiene uno o más síntomas de otra afección). La prevención se realiza generalmente en un sujeto que está en riesgo de desarrollar una afección o disfunción física. Se dice que dichos
15 sujetos necesitan prevención. Por ejemplo, la reducción en los niveles de TNF-alfa en comparación con los niveles previos a la administración de los péptidos de la invención sería prueba de un tratamiento satisfactorio. La mejora en el control glucémico es otra forma de mostrar que el tratamiento ha tenido un efecto. Además, si la prueba de A1C, la prueba de glucosa plasmática en ayunas (FPG) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) muestran que los resultados de la prueba prediabética se mantienen en niveles de prueba prediabética, se puede concluir que la
20 prevención de la diabetes en el sujeto prediabético ha tenido éxito. Además, si una víctima de quemaduras o un sujeto expuesto a una lesión por radiación aguda no desarrolla endotoxemia o los signos y síntomas de endotoxemia son leves, se puede considerar que la administración del péptido tiene un efecto en la prevención.

[0140] Los procedimientos de prevención descritos en este documento comprenden además la selección de
25 dicho sujeto en riesgo de una afección, p. ej., aquellas que surgen de la inflamación o destrucción de tejido autoinmunitaria o una afección mejorada por estimulación del aumento de la masa de células beta en un individuo con diabetes, o sujeto que tiene quemaduras graves o que ha sufrido una lesión por radiación aguda y por lo tanto es susceptible de endotoxemia, o un sujeto que es un fumador y, por lo tanto, susceptible de EPOC, o disfunción física como se describe en este documento, antes de administrar un péptido o un mutante, variante, análogo o
30 derivado del mismo, al sujeto, para de ese modo prevenir la afección o disfunción. Dicha selección la lleva a cabo el experto en la materia mediante una serie de procedimientos disponibles. Por ejemplo, la evaluación de los factores de riesgo o el diagnóstico de una enfermedad que se sabe que causa la afección o disfunción, o tratamiento o terapia que se sabe que causa la afección o disfunción. Los sujetos que tienen una enfermedad o lesión o antecedentes familiares relevantes que se sabe que contribuyen a la afección, en general se considera que tienen
35 mayor riesgo.

[0141] Como se usa en el presente documento, los términos «tratar» o «tratamiento» se refiere a medidas de tratamiento terapéutico, en las que el objetivo es prevenir o ralentizar el desarrollo de la enfermedad, tal como reducir al menos un efecto o síntoma de una afección, enfermedad o trastorno asociado con la inflamación. El
40 tratamiento en general es «eficaz» si uno o más síntomas mejoran o los niveles de marcadores clínicos, tales como TNF-alfa, CRP, glucosa en sangre y/o HbA1c, están dentro de los valores normales o más cercanos a los valores de referencia normales que a los valores anormales que reflejan inflamación o mal control glucémico, dependiendo de la afección, como se define ese término en este documento. Alternativamente, el tratamiento es «eficaz» si se ralentiza el avance de una enfermedad, se reduce la presentación de un síntoma o un marcador de una enfermedad.
45 Es decir, «tratamiento» incluye la mejora de los síntomas o marcadores, la ralentización del avance o la ralentización del empeoramiento de al menos un síntoma que se esperaría en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de uno o más síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estado de enfermedad estabilizado (es decir, no empeora), retraso o ralentización del avance de la enfermedad, mejora o paliación del estado de la enfermedad. «Tratamiento» también puede significar la
50 prolongación de la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen pacientes con uno o más síntomas de inflamación, tales como síntomas asociados con artritis reumatoide, EPOC o diabetes, incluyendo diabetes tipo 1 y tipo 2. En algunos aspectos de todas las realizaciones de la invención, el sujeto que necesita tratamiento tiene fibrosis quística o ha sufrido quemaduras o radiación aguda y, por lo tanto, está en alto riesgo de desarrollar endotoxemia.
55

[0142] Los niveles de TNF-alfa se pueden evaluar, por ejemplo, usando cualquiera de una serie de kits de ELISA comerciales fácilmente disponibles. La prueba de A1C, FPG y OGTT se usan comúnmente para evaluar el control glucémico en el diagnóstico y atención integral de la diabetes y la prediabetes.

[0143] En algunos aspectos, la descripción se refiere a procedimientos para prevenir la inflamación administrando los péptidos como se ha descrito a un individuo que aún no presenta síntomas de inflamación. Por ejemplo, los péptidos se pueden administrar a un individuo con riesgo alto de desarrollar diabetes o con diagnóstico de prediabetes, una afección definida por el aumento de los niveles de azúcar en sangre, pero niveles que aún no se consideran diabéticos, pero que todavía no tienen diabetes, para ayudar a ralentizar el desarrollo o prevenir el desarrollo de diabetes desde la etapa prediabética.

[0144] Antes de que las personas desarrollen diabetes tipo 2, casi siempre tienen «prediabetes», niveles de glucosa en sangre que son más altos de lo normal, pero que aún no son lo suficientemente altos como para ser diagnosticados como diabetes. Investigaciones recientes han demostrado que algunos daños a largo plazo en el cuerpo, especialmente el corazón y el sistema circulatorio, pueden estar ya ocurriendo durante la prediabetes. Hay una serie de pruebas que se pueden usar para determinar si, p. ej., un sujeto humano está afectado por la prediabetes. Dichas pruebas incluyen, p. ej., la prueba de A1C, la prueba de glucosa plasmática en ayunas (FPG) y la prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT). Los individuos prediabéticos típicamente tienen una puntuación de o superior a 5,7 % a inferior a 6,5 % en la prueba A1C, mientras que los diabéticos tienen una puntuación superior a 6,5 % en esta prueba. Los individuos prediabéticos también tienen una puntuación típicamente de o superior a 100 mg/dl a inferior a 126 mg/dl usando la prueba FPG, mientras que los diabéticos tienen una puntuación superior a 126 mg/dl. Los individuos prediabéticos típicamente tienen una puntuación de o superior a 140 a inferior a 200 mg/dl usando la prueba OGTT, mientras que los individuos diabéticos tienen una puntuación superior a 200 mg/dl. Por lo tanto, un procedimiento para prevenir la diabetes según la presente descripción puede comprender administrar el péptido a un individuo que se ha diagnosticado como prediabético, p. ej., usando cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente.

[0145] La expresión «cantidad eficaz» como se usa en este documento se refiere a la cantidad de una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, para disminuir al menos uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno. y se refiere a una cantidad suficiente de composición farmacológica para proporcionar el efecto deseado. La frase «cantidad terapéuticamente eficaz» como se usa en este documento significa una cantidad suficiente de la composición para tratar un trastorno, con una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento médico. La expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» por lo tanto se refiere a una cantidad de la composición como se describe en este documento que es suficiente para efectuar una reducción terapéutica o profiláctica en un síntoma o marcador clínico asociado con niveles aumentados de inflamación o hiperglucemia cuando se administra a un sujeto típico que tiene anemia, anemia de inflamación o diabetes tipo I. Típicamente, la reducción de más de 20 % de un marcador de enfermedad, tal como un marcador inflamatorio, p. ej., TNF-alfa, es indicativo de un tratamiento eficaz. En algunos casos, la reducción de más del 50 % o más del 75 % de la cantidad de niveles de TNF-alfa en el individuo antes de administrar los péptidos de la invención es indicativo de un tratamiento eficaz.

[0146] Una reducción terapéutica o profilácticamente significativa en un síntoma es, p. ej. al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 125 %, al menos aproximadamente 150 % o más en un parámetro medido en comparación con un sujeto control o no tratado o el estado del sujeto antes de administrar el péptido. Los parámetros medidos o medibles incluyen marcadores de enfermedad clínicamente detectables, por ejemplo, niveles elevados o reducidos de un marcador biológico, tales como TNF-alfa, así como parámetros relacionados con una escala de síntomas clínicamente aceptada o marcadores de inflamación. Se entenderá, sin embargo, que el uso diario total de las composiciones y formulaciones como se describen en este documento lo decidirá el médico que atiende, basándose en el buen criterio médico. La cantidad exacta requerida variará dependiendo de factores tales como el tipo de enfermedad que se trata, sexo, edad y peso del sujeto.

[0147] Con respecto al tratamiento de un sujeto con inflamación, destrucción de tejido autoinmunitaria o diabetes tipo I, la expresión «cantidad terapéuticamente eficaz» se refiere a la cantidad que es segura y suficiente para retrasar el desarrollo de uno o más síntomas y da como resultado la disminución en la cantidad de un marcador inflamatorio, p. ej., concentraciones de TNF- α o CRP, o mejora en los niveles de glucosa en sangre en pacientes en comparación con la cantidad del marcador inflamatorio o los niveles de glucosa en sangre antes de administrar el péptido. Por lo tanto, la cantidad puede mejorar o causar una disminución en al menos un síntoma de inflamación, destrucción de tejido autoinmunitaria o diabetes de tipo I, o ralentizar el curso del avance de la enfermedad, tal como estabilizar los niveles de glucosa en sangre. La cantidad eficaz para el tratamiento de una enfermedad depende del tipo de enfermedad, la especie que se trata, la edad y el estado general del sujeto, el modo de administración, etc.

Por lo tanto, no es posible especificar la «cantidad eficaz» exacta. Sin embargo, para cualquier caso dado, un experto en la materia puede determinar una «cantidad eficaz» adecuada usando solo experimentación rutinaria. La eficacia del tratamiento puede ser evaluada por un profesional habitual, por ejemplo, se puede evaluar la eficacia en modelos animales conocidos de inflamación (p. ej., modelo de LPS), destrucción de tejido autoinmunitaria (p. ej., modelo de CAIA) o diabetes (p. ej., modelo de ratón db/db). Cuando se usa un modelo de animal experimental, la eficacia del tratamiento se pone de manifiesto cuando se muestra una reducción en un síntoma de inflamación, destrucción de tejido autoinmunitaria o hiperglucemia frente a animales no tratados.

[0148] Como se usa en este documento, los términos «administrar» e «introducir» se usan de forma intercambiable en este documento y se refieren a la colocación de los agentes terapéuticos, tales como uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, en un sujeto por un procedimiento o ruta que da como resultado el suministro de dicho(s) agente(s) en un sitio deseado. Los compuestos se pueden administrar por cualquier vía adecuada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto.

[0149] El uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se pueden administrar por cualquier vía conocida en la técnica o descrita en este documento, por ejemplo, vía oral, parenteral (p. ej., vía intravenosa o intramuscular), intraperitoneal, rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, piel (parche) u ocular. El uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se pueden administrar en cualquier dosis o régimen de dosificación. También se pueden usar bombas, tales como las usadas para la administración de insulina.

Dosificación

[0150] Con respecto a los procedimientos terapéuticos descritos en este documento, no se pretende que la administración de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se limite a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; la presente invención contempla todos los modos de administración, que incluyen la intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravesicular, intraarticular, intralesional, subcutánea o cualquier otra vía suficiente para proporcionar una dosis adecuada para tratar el trastorno relacionado con la inflamación. El agente terapéutico se puede administrar al paciente en una sola dosis o en dosis múltiples. Cuando se administran dosis múltiples, las dosis pueden separarse una de otra, por ejemplo, una hora, tres horas, seis horas, ocho horas, un día, dos días, una semana, dos semanas o un mes. Por ejemplo, el agente terapéutico se puede administrar durante, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20 o más semanas. Debe entenderse que, para cualquier sujeto particular, las pautas posológicas específicas deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Por ejemplo, la dosificación del agente terapéutico puede aumentarse si la dosis más baja no proporciona suficiente actividad terapéutica.

[0151] Aunque el médico que atiende decidirá finalmente la cantidad y el régimen de dosificación adecuados, pueden proporcionarse cantidades terapéuticamente eficaces del uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, en una dosis de 0,0001, 0,01, 0,01, 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 500 o 1000 mg/kg o µg/kg. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de curvas dosis-respuesta de bioensayos o sistemas de ensayo de modelos *in vitro* o animal.

[0152] Las dosificaciones para un paciente o sujeto particular las puede determinar un experto en la materia usando consideraciones convencionales (p. ej., mediante un protocolo farmacológico convencional adecuado). Un médico puede, por ejemplo, recetar una dosis relativamente baja al principio, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtenga una respuesta adecuada. La dosis administrada a un paciente es suficiente para producir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente a lo largo del tiempo, o, p. ej., para reducir los síntomas u otra actividad adecuada, dependiendo de la aplicación. La dosis se determina por la eficacia de la formulación particular, y la actividad, estabilidad o semivida en el suero de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, y la afección del paciente, así como como el peso corporal o la superficie específica del paciente que se va a tratar. El tamaño de la dosis también está determinado por la existencia, naturaleza y extensión de cualquier efecto secundario adverso que acompañe a la administración de un vector, formulación o similar particular en un sujeto particular. Las composiciones terapéuticas que comprenden uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se prueban opcionalmente en uno o más modelos animales de la enfermedad *in vitro* y/o *in vivo* adecuados, tales como modelos de inflamación o diabetes, para confirmar la eficacia, metabolismo tisular, y para estimar dosificaciones, según procedimientos bien conocidos en la técnica. En particular, las dosificaciones se pueden determinar

inicialmente por la actividad, estabilidad u otras medidas adecuadas de tratamiento frente a no tratamiento (p. ej., comparación de células tratadas frente a no tratadas o modelos animales), en un ensayo relevante. Las formulaciones se administran a una velocidad determinada por la DL50 de la formulación relevante, y/o la observación de cualquier efecto secundario de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos. La administración puede realizarse mediante dosis únicas o divididas.

[0153] Para determinar la cantidad eficaz de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, para administrar en el tratamiento o profilaxis de la enfermedad, el médico evalúa los niveles plasmáticos en circulación, las toxicidades de formulación y el avance de la enfermedad.

[0154] La eficacia y la toxicidad del compuesto se pueden determinar por procedimientos farmacéuticos estándar en cultivos celulares o animales de experimentación, por ejemplo, DE50 (la dosis es eficaz en 50 % de la población) y DL50 (la dosis es letal para 50 % de la población). La relación de efectos tóxicos a terapéuticos de la dosis es el índice terapéutico, y se puede expresar como la relación, DL50/DE50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que presentan índices terapéuticos altos.

[0155] Estos compuestos se pueden administrar a seres humanos y otros animales para terapia por cualquier vía de administración adecuada que funcione para péptidos pequeños, incluyendo por vía oral, nasal, como, por ejemplo, un aerosol, por vía rectal, intravaginal, parenteral, intracisternal y tópica, como mediante polvos, pomadas o gotas, incluyendo vía bucal y sublingual.

[0156] Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un sujeto, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el sujeto.

[0157] El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto particular de la presente invención usado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular usando, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular usado, la edad, el sexo, peso, estado, salud general y el historial médico previo del paciente tratado, y factores similares bien conocidos en la materia médica.

35 **Formulación de composiciones farmacéuticas: «vehículos farmacéuticamente aceptables»**

[0158] La administración de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, puede ser por cualquier medio adecuado que dé como resultado una concentración de la proteína que trata el trastorno. El compuesto puede estar contenido en cualquier cantidad adecuada en cualquier sustancia vehículo adecuada, y en general está presente en una cantidad de 1-95 % en peso del peso total de la composición. La composición se puede proporcionar en una forma farmacéutica que es adecuada para la vía de administración oral, parenteral (p. ej., intravenosa o intramuscular), intraperitoneal, rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, piel (parche) u ocular. Por lo tanto, la composición puede estar en forma de, por ejemplo, comprimidos, cápsulas, píldoras, polvos, granulados, suspensiones, emulsiones, soluciones, geles que incluyen hidrogeles, pastas, pomadas, cremas, emplastos, pociones, dispositivos de administración osmótica, supositorios, enemas, inyectables, implantes, pulverizadores o aerosoles. Las composiciones farmacéuticas se pueden formular según la práctica farmacéutica convencional (véase, p. ej. Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición, 2000, ed. A.R. Gennaro, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, eds. J. Swarbrick y J. C. Boylan, 1988-1999, Marcel Dekker, Nueva York).

[0159] Las composiciones farmacéuticas según la invención se pueden formular para liberar el compuesto activo inmediatamente después de la administración o en cualquier período de tiempo o tiempo predeterminado después de la administración. Estos últimos tipos de composiciones se conocen en general como formulaciones de liberación controlada, que incluyen (i) formulaciones que crean concentraciones sustancialmente constantes del(de los) agente(s) de la invención dentro del cuerpo durante un período de tiempo prolongado; (ii) formulaciones que después de un tiempo de retardo predeterminado crean concentraciones sustancialmente constantes del(de los) agente(s) de la invención dentro del cuerpo durante un período de tiempo prolongado; (iii) formulaciones que mantienen la acción del(de los) agente(s) durante un período de tiempo predeterminado al mantener un nivel relativamente constante y eficaz del(de los) agente(s) en el cuerpo con minimización concomitante de los efectos

secundarios indeseables asociados con las fluctuaciones en el nivel plasmático del(de los) agente(s) (patrón cinético de diente de sierra); (iv) formulaciones que localizan la acción del(de los) agente(s), por ejemplo, la colocación espacial de una composición de liberación controlada adyacente a o en el tejido u órgano enfermo; (v) formulaciones que logran la conveniencia de la dosificación p. ej., administrando la composición una vez por semana o una vez

5

cada dos semanas; y (vi) formulaciones que dirigen la acción del(de los) agente(s) usando vehículos o derivados químicos para suministrar el producto terapéutico en un tipo de célula objetivo particular. La administración de la proteína en forma de una formulación de liberación controlada es especialmente preferida para compuestos que tienen una ventana de absorción estrecha en el tracto gastrointestinal o una vida media biológica relativamente corta.

10

[0160] Puede llevarse a cabo cualquiera de una serie de estrategias con el fin de obtener una liberación controlada en la que la velocidad de liberación sea mayor que la velocidad de metabolismo del compuesto en cuestión. En un ejemplo, la liberación controlada se obtiene mediante la selección adecuada de diversos parámetros de formulación e ingredientes, que incluyen, p. ej., diferentes tipos de composiciones y recubrimientos de liberación controlada. De este modo, la proteína se formula con excipientes adecuados en una composición farmacéutica que,

15

tras la administración, libera la proteína de una manera controlada. Los ejemplos incluyen composiciones de comprimido o cápsula de unidad individual o múltiple, soluciones oleosas, suspensiones, emulsiones, microcápsulas, complejos moleculares, microsferas, nanopartículas, parches y liposomas.

20

[0161] Como se usa en este documento, las frases "administración parenteral" y "administrada por vía parenteral" como se usan en este documento, significan modos de administración distintos a la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal,

25

intracerebroespinal e intraesternal. Las frases "administración sistémica", "administrado sistémicamente", "administración periférica" y "administrado periféricamente" como se usan en el presente documento, significan las composiciones terapéuticas de administración diferentes a las directamente en un tumor de modo que entren en el sistema animal y, por lo tanto, están sujetas al metabolismo y otros procesos similares.

30

[0162] La frase «farmacéuticamente aceptable» se usa en este documento para referirse a los compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que, basándose en el buen criterio médico, son adecuados para el uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable. La frase «vehículo farmacéuticamente aceptable» como se usa en el presente documento significa un material, composición o excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como una carga líquida o sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en el mantenimiento de la actividad o llevar o transportar los presentes agentes de un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano o parte del cuerpo. Además de ser «farmacéuticamente aceptable» según se define dicho término en este documento, cada vehículo también debe ser «aceptable» en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación. La formulación farmacéutica que comprende uno o más péptidos como se describe en el presente documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, en combinación con uno o más ingredientes farmacéuticamente aceptables. El vehículo puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, crema o una cápsula. Estas preparaciones farmacéuticas son un objeto adicional de la invención. Normalmente, la cantidad de compuestos activos está entre 0,1-95 % en peso de la preparación, preferiblemente entre 0,2-20 % en peso en preparaciones para uso parenteral y preferiblemente entre 1

35

40

45

y 50 % en peso en preparaciones para administración oral. Para el uso clínico de los procedimientos descritos en este documento, la composición de suministro dirigida de la invención se formula en composiciones farmacéuticas o formulaciones farmacéuticas para administración parenteral, p. ej., intravenosa; mucosa, p. ej., intranasal; enteral, p. ej., oral; tópica, p. ej., transdérmica; ocular, p. ej., a través de escarificación corneal u otro modo de administración. La composición farmacéutica contiene un compuesto de la invención en combinación con uno o más ingredientes

50

farmacéuticamente aceptables. El vehículo puede estar en forma de un diluyente sólido, semisólido o líquido, crema o una cápsula.

[0163] La expresión «vehículos farmacéuticamente aceptables» pretende incluir todos los disolventes, diluyentes u otros vehículos líquidos, auxiliares de dispersión o suspensión, agentes tensioactivos, agentes isotónicos, agentes espesantes o emulsionantes, conservantes, aglutinantes sólidos, lubricantes y similares, según sea adecuado para la forma farmacéutica particular deseada. Típicamente, dichos compuestos son llevados o transportados desde un órgano, o parte del cuerpo, a otro órgano, o parte del cuerpo. Cada vehículo debe ser «aceptable» en el sentido de ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y no ser perjudicial para el paciente. Algunos ejemplos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables

55

incluyen: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados funcionales, tales como carboximetilcelulosa sódica, etilcelulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras para supositorios; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tales como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como hidróxido de magnesio e hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua libre de pirógenos; solución salina isotónica; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones tampón de fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas usadas en formulaciones farmacéuticas.

10

[0164] La expresión «composición farmacéutica» se usa en el presente documento para referirse a composiciones o formulaciones que normalmente comprenden un excipiente, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es adecuado para la administración a mamíferos, y preferiblemente a seres humanos o células humanas. Dichas composiciones se pueden formular específicamente para administración por una o más de una serie de vías, que incluyen, pero no se limitan a, oral, ocular, parenteral, intravenosa, intraarterial, subcutánea, intranasal, sublingual, intraespinal, intracerebroventricular y similares. Además, las composiciones para administración tópica (p. ej., mucosa oral, mucosa respiratoria) y/u oral pueden formar soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues bucales o polvos, como se conoce en la técnica, y se describen en este documento. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de vehículos, estabilizantes y adyuvantes, University of the Sciences in Philadelphia (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons, 21^a Ed.

[0165] En algunas realizaciones, los compuestos de la presente invención pueden contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por lo tanto, son capaces de formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión «sales, ésteres, amidas y profármacos farmacéuticamente aceptables» como se usa en este documento se refiere a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas y profármacos de los compuestos de la presente invención que son, basándose en el buen criterio médico, adecuados para el uso en contacto con los tejidos de pacientes sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaz para su uso pretendido de los compuestos de la invención. El término «sales» se refiere a las sales de adición de ácidos inorgánicos y orgánicos relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estas sales pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislando la sal así formada. Estos pueden incluir cationes basados en los metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos que incluyen, pero no se limitan a, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina y similares (véase, por ejemplo, Berge S. M., y col. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66, 1).

[0166] La expresión «ésteres farmacéuticamente aceptables» se refiere a los productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres pueden prepararse *in situ* durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los ácidos carboxílicos se pueden convertir en ésteres mediante tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. La expresión también pretende incluir grupos hidrocarbonados inferiores capaces de solvatare en condiciones fisiológicas, p. ej., ésteres de alquilo, ésteres de metilo, etilo y propilo.

[0167] Como se usa en este documento, «sales o profármacos farmacéuticamente aceptables» son sales o profármacos que son, basándose en el buen criterio médico, adecuados para el uso en contacto con los tejidos del sujeto sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, acordes con una relación beneficio/riesgo razonable y eficaz para su uso previsto.

[0168] El término «profármaco» se refiere a compuestos que se transforman rápidamente *in vivo* para producir uno o más péptidos funcionalmente activos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos. Se proporciona una discusión exhaustiva en T. Higachi y V. Stella, "Pro-drug as Novel Delivery Systems", vol. 14 de la serie de simposios A. C. S., y en A. C. S. Symposium Series, p. en *Bioreversible Carriers in: Drug Design*, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Como se usa en este documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración *in vivo*, se metaboliza o se convierte de otro modo en la forma biológica, farmacéutica o terapéuticamente activa del

compuesto. Un profármaco de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, para enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, para mejorar el sabor de un compuesto o para alterar otras características o propiedades de un compuesto. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y del metabolismo de fármacos in vivo, una vez se tiene una forma farmacéuticamente activa del uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, los expertos en la técnica farmacéutica en general pueden diseñar profármacos del compuesto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, N. Y., páginas 388-392). Los procedimientos convencionales para la selección y preparación de profármacos adecuados se describen, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Los ejemplos adecuados de profármacos incluyen ésteres de metilo, etilo y glicerol del ácido correspondiente.

Composiciones parenterales

15

[0169] La composición farmacéutica se puede administrar por vía parenteral por inyección, infusión o implante (subcutáneo, intravenoso, intramuscular, intraperitoneal o similar) en formas farmacéuticas, formulaciones, o mediante dispositivos de administración o implantes adecuados que contienen vehículos y adyuvantes farmacéuticamente aceptables, no tóxicos convencionales. La formulación y preparación de dichas composiciones son bien conocidas por los expertos en la técnica de la formulación farmacéutica.

20

[0170] Las composiciones para uso parenteral se pueden proporcionar en formas farmacéuticas unitarias (p. ej., en ampollas de dosis única), o en viales que contienen varias dosis y en los que se puede añadir un conservante adecuado (véase más adelante). La composición puede estar en forma de una solución, una suspensión, una emulsión, un dispositivo de infusión o un dispositivo de suministro para implante, o se puede presentar como un polvo seco para reconstituir con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Además del(de los) agente(s) activo(s), la composición puede incluir vehículos y/o excipientes parenteralmente aceptables adecuados. El(los) agente(s) activo(s) se pueden incorporar en microesferas, microcápsulas, nanopartículas, liposomas o similares para liberación controlada. Además, la composición puede incluir agentes de suspensión, solubilización, estabilización, ajuste del pH, agentes de ajuste de la tonicidad y/o agentes dispersantes.

25

[0171] Como se ha indicado anteriormente, las composiciones farmacéuticas según la invención pueden estar en una forma adecuada para inyección estéril. Para preparar dicha composición, el(los) agente(s) activo(s) adecuados se disuelven o suspenden en un vehículo líquido parenteralmente aceptable. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden usar están el agua, agua ajustada a un pH adecuado mediante la adición de una cantidad adecuada de ácido clorhídrico, hidróxido de sodio o un tampón adecuado, 1,3-butanodiol, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de cloruro sódico isotónica. La formulación acuosa también puede contener uno o más conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoato de metilo, etilo o n-propilo). En los casos en que uno de los compuestos es solo poco o ligeramente soluble en agua, se puede añadir un agente de solubilización o potenciador de la disolución, o el disolvente puede incluir 10-60 % en p/p de propilenglicol o similar.

30

[0172] También pueden estar presentes agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como laurilsulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de recubrimiento, agentes edulcorantes, saborizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes. en las composiciones.

45

[0173] Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, hidrocloreuro de cisteína, bisulfato de sodio, metabisulfato de sodio, sulfito de sodio y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

50

[0174] Las formulaciones de la presente invención incluyen las adecuadas para la administración intravenosa, oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar convenientemente en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica de la farmacia. La cantidad de principio activo que puede combinarse con un material vehículo para producir una forma farmacéutica unitaria en general será la cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico.

55

[0175] Los procedimientos para preparar estas formulaciones o composiciones incluyen la etapa de asociar un compuesto de la presente invención con el vehículo y, opcionalmente, uno o más ingredientes auxiliares. En general, las formulaciones se preparan asociando de forma uniforme e íntima un compuesto de la presente invención con vehículos líquidos, o vehículos sólidos finamente divididos, o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto.

[0176] Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas (que usan una base aromatizada, en general; sacarosa y goma arábica o tragacanto), polvos, gránulos, o como una solución o una suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o como una emulsión líquida de aceite en agua o de agua en aceite, o como elixir o jarabe, o como pastillas (usando una base inerte, como gelatina y glicerina, o sacarosa y acacia) y/o como enjuagues bucales y similares, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención como principio activo. Un compuesto de la presente invención también se puede administrar como un bolo, electuario o pasta.

[0177] Las composiciones farmacéuticas de esta invención adecuadas para administración parenteral comprenden uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas, estériles, farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que pueden reconstituirse en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto o agentes de suspensión o espesantes.

[0178] Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que se pueden usar en las composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

[0179] Estas composiciones también pueden contener adyuvantes, tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diferentes agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenolsorbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio y similares en las composiciones. Además, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

[0180] En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo que tiene poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y la forma cristalina. Alternativamente, la absorción retardada de una forma de fármaco administrada por vía parenteral se logra disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo de aceite.

[0181] Las formas de depósito inyectables se preparan formando matrices microencapsuladas de los presentes compuestos en polímeros biodegradables; tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero, y la naturaleza del polímero particular usado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de depósito también se preparan atrapando el fármaco, tal como uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, en liposomas o microemulsiones que son compatibles con el tejido corporal.

[0182] Independientemente de la vía de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables por procedimientos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

Composiciones parenterales de liberación controlada

[0183] Las composiciones parenterales de liberación controlada pueden estar en forma de suspensiones acuosas, microesferas, microcápsulas, microesferas magnéticas, soluciones oleosas, suspensiones oleosas o emulsiones. La composición también se puede incorporar en vehículos, liposomas, nanopartículas, implantes o dispositivos de infusión biocompatibles.

[0184] Los materiales para usar en la preparación de microesferas y/o microcápsulas son, por ejemplo, polímeros biodegradables/bioerosionables, tales como poligalactia poli(cianoacrilato de isobutilo), poli(2-hidroxietil-L-glutaminina), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), y mezclas de los mismos. Los vehículos biocompatibles que se pueden usar cuando se formula una formulación parenteral de liberación controlada son hidratos de carbono (p. ej., dextranos), proteínas (p. ej., albúmina), lipoproteínas o anticuerpos. Los materiales para usar en implantes pueden ser no biodegradables (p. ej., polidimetilsiloxano) o biodegradables (p. ej., poli(caprolactona), poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) o poli(orto ésteres)), o combinaciones de los mismos.

15 Formas farmacéuticas sólidas para uso oral

[0185] Las formulaciones para uso oral incluyen comprimidos que contienen el(los) principio(s) activo(s) en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, y dichas formulaciones son conocidas por los expertos en la técnica (p. ej. patente de EE.UU. n.º: 5.817.307; 5.824.300; 5.830.456; 5.846.526; 5.882.640; 5.910.304; 6.036.949; 6.036.949; y 6.372.218) Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes o cargas inertes (p. ej., sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de granulación y disgregación (p. ej., derivados de celulosa que incluyen celulosa microcristalina, almidones que incluyen almidón de patata, croscarmelosa de sodio, alginatos o ácido alginico); agentes aglutinantes (p. ej., sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábica, ácido alginico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio y aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes y antiadhesivos (p. ej., estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes y similares.

[0186] Los comprimidos pueden no estar recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y la absorción en el tracto gastrointestinal y proporcionar así una acción sostenida durante un período más prolongado. El recubrimiento puede adaptarse para liberar la proteína en un patrón predeterminado (p. ej., con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o puede estar adaptado para no liberar el(los) agente(s) hasta después del paso del estómago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (p. ej., basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (p. ej., basado en copolímero de ácido metacrílico, acetato ftalato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, acetato succinato de hidroxipropilmetilcelulosa, poli(acetato ftalato de vinilo), goma laca y/o etilcelulosa). Además, se puede usar un material de retardo tal como, p. ej., monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

[0187] Las composiciones de comprimidos sólidos pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de cambios químicos no deseados (p. ej., degradación química antes de la liberación de las sustancias activas). El recubrimiento puede aplicarse sobre la forma farmacéutica sólida de una manera similar a la descrita en Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, véase antes.

[0188] Las composiciones de la invención se pueden mezclar juntas en el comprimido, o se pueden dividir. En un ejemplo, un primer agente está contenido en el interior del comprimido, y un segundo agente está en el exterior, de modo que una parte sustancial del segundo agente es liberado antes de la liberación del primer agente.

[0189] Las formulaciones para uso oral también se pueden presentar como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el ingrediente activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (p. ej., almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín) o como cápsulas de gelatina blanda en donde el principio activo se mezcla con agua o un medio de aceite, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados se pueden preparar usando los ingredientes mencionados anteriormente en los comprimidos y cápsulas de una manera convencional usando, p. ej., un mezclador, un aparato de lecho fluido o un equipo de secado por atomización.

[0190] En formas farmacéuticas sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como citrato de sodio o fosfato de dicalcio, y/o cualquiera de los siguientes:

5 cargas o diluyentes, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábica; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato de calcio, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, algunos silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la solución, tales como parafina; aceleradores de absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes,

10 tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, laurilsulfato de sodio y mezclas de los mismos; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas también pueden comprender agentes tamponantes. Las composiciones sólidas de un tipo similar también pueden usarse como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras

15 usando excipientes, tales como lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

[0191] Un comprimido se puede hacer por compresión o moldeo, opcionalmente con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos por compresión pueden prepararse usando un aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetilcelulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato sódico de almidón o carboximetilcelulosa sódica reticulada), tensioactivo o agente dispersante. Los comprimidos moldeados pueden prepararse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

20

[0192] Los comprimidos y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, opcionalmente se pueden ranurar o preparar con recubrimientos y cubiertas, tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la industria farmacéutica de la formulación. También se pueden formular para proporcionar así una liberación lenta o controlada del principio activo en el mismo usando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables

30 para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices de polímeros, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, mediante filtración a través de un filtro que retiene bacterias o incorporando agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o en algún otro medio inyectable estéril inmediatamente antes del uso. Estas composiciones también pueden contener opcionalmente agentes opacificantes y pueden ser de una composición que libera el(los) principio(s) activo(s) solo, o preferiblemente, en una cierta parte del tracto gastrointestinal, opcionalmente, de forma retardada. Los ejemplos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es adecuado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente. En un aspecto, se puede administrar una solución de resorvina y/o protectina o precursor o análogo de la misma como colirio para la neovascularización ocular o gotas de oído para tratar la otitis.

40

[0193] Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.

[0194] Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados habitualmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitán y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden

50 incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, perfumantes y conservantes.

[0195] Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes de suspensión como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, sorbitol polioxietilénico y ésteres de sorbitán, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

55

[0196] Las formas farmacéuticas para la administración tópica o transdérmica de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, incluyen polvos, aerosoles, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhalantes. El compuesto activo se

puede mezclar en condiciones estériles con un vehículo farmacéuticamente aceptable, y con cualquier conservante, tampón o propulsor que pueda ser necesario.

[0197] Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además de un compuesto activo de esta invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de zinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y aerosoles pueden contener, además de un compuesto de esta invención, excipientes, tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los aerosoles pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, como butano y propano.

[0198] Los parches transdérmicos tienen la ventaja adicional de proporcionar el suministro controlado de los compuestos (resolvinas y/o proteínas y/o precursores o análogos de los mismos) de la presente invención, al cuerpo. Dichas formas farmacéuticas se pueden hacer disolviendo o dispersando el compuesto en el medio adecuado. Los potenciadores de la absorción también se pueden usar para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse proporcionando una membrana controladora de la velocidad o dispersando el compuesto activo en una matriz polimérica o gel. En otro aspecto, los polímeros biodegradables o absorbibles pueden proporcionar una liberación prolongada, a menudo localizada, de agentes polipeptídicos. Los beneficios potenciales de una mayor semivida o liberación prolongada para un agente terapéutico son claros. Un beneficio potencial de la liberación localizada es la capacidad de alcanzar dosis o concentraciones localizadas mucho mayores, durante períodos de tiempo mayores, en relación con la administración sistémica más amplia, con el potencial de evitar también posibles efectos secundarios indeseables que pueden ocurrir con la administración sistémica.

[0199] La matriz polimérica bioabsorbible adecuada para el suministro del uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se puede seleccionar de una variedad de polímeros bioabsorbibles sintéticos, que se describen ampliamente en la bibliografía. Dichos polímeros sintéticos bioabsorbibles, biocompatibles, que pueden liberar proteínas durante varias semanas o meses pueden incluir, por ejemplo, poli- α -hidroxiácidos (por ejemplo, polilactidas, poliglicólidos y sus copolímeros), polianhídridos, polioortoésteres, copolímeros de bloques segmentados de polietilenglicol y poli(tereftalato de butileno) (Polyactive™), polímeros derivados de tirosina o poli(éster-amidas). Los polímeros bioabsorbibles adecuados para usar en la fabricación de materiales e implantes de suministro de fármacos se describen, p. ej. en las patentes de EE.UU. n.º 4.968.317, 5.618.563, entre otros, y en "Biomedical Polymers" editado por S. W. Shalaby, Carl Hanser Verlag, Múnich, Viena, Nueva York, 1994 y en muchas referencias citadas en las publicaciones anteriores. El polímero bioabsorbible particular que debe seleccionarse dependerá del paciente particular que se esté tratando.

Terapia génica

[0200] Uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se pueden usar eficazmente en el tratamiento mediante terapia génica. Véase, en general, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.399.346. El principio general es introducir el polinucleótido en una célula objetivo en un paciente.

[0201] La entrada en la célula se facilita mediante técnicas adecuadas conocidas en la materia, tales como proporcionar el polinucleótido en forma de un vector adecuado, o la encapsulación del polinucleótido en un liposoma.

[0202] Un modo deseado de terapia génica es proporcionar el polinucleótido de tal manera que se replique dentro de la célula, potenciando y prolongando el efecto deseado. Por lo tanto, el polinucleótido está operativamente unido a un promotor adecuado, tal como el promotor natural del gen correspondiente, un promotor heterólogo que es intrínsecamente activo en células hepáticas, neuronales, óseas, musculares, de la piel, de articulaciones o del cartílago, o un promotor heterólogo que puede ser inducido por un agente adecuado.

[0203] Los vectores de expresión compatibles con células eucariotas, preferiblemente los compatibles con células de vertebrados, se pueden usar para producir construcciones recombinantes para la expresión de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, incluyendo proteínas de fusión con uno o más péptidos como se describen en el presente documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos. Los vectores de expresión de células eucarióticas son bien conocidos en la técnica y están disponibles en varias fuentes comerciales. Típicamente, se proporcionan dichos vectores que contienen sitios de restricción convenientes para la inserción del segmento de ADN deseado. Estos vectores pueden

ser vectores víricos, tales como adenovirus, virus adenoasociado, virus de la viruela, tales como un orthopoxvirus (vaccinia y vaccinia atenuada), viruela aviar, lentivirus, virus de la leucemia murina de Moloney, etc. Alternativamente, se pueden usar vectores de expresión plasmídicos.

5 **[0204]** Los sistemas de vectores víricos que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a, (a) vectores de adenovirus; (b) vectores de retrovirus; (c) vectores de virus adenoasociados; (d) vectores del virus del herpes simple; (e) vectores de SV40; (f) vectores de virus de polio; (g) vectores de virus del papiloma; (h) vectores de picornavirus; (i) vectores de virus de la viruela, tales como un orthopoxvirus, p. ej., vectores de virus vaccinia o virus de la viruela aviar, p. ej. viruela de canario o viruela de aves de corral; y (j) un adenovirus dependientes de virus
10 auxiliar o *gutless*. En una realización preferida, el vector es un adenovirus. Los virus de replicación defectuosa también pueden ser ventajosos.

[0205] El vector puede o no estar incorporado en el genoma de las células. Las construcciones pueden incluir secuencias víricas para la transfección, si se desea. Alternativamente, la construcción se puede incorporar en
15 vectores capaces de replicación episomal, por ejemplo, vectores EPV y EBV.

[0206] Por «operativamente unido» se entiende que una molécula de ácido nucleico y una o más secuencias reguladoras (p. ej., un promotor) están conectadas de modo que permiten la expresión y/o secreción del producto (p. ej., una proteína) de la molécula de ácido nucleico cuando las moléculas adecuadas (p. ej., proteínas activadoras transcripcionales) están unidas a las secuencias reguladoras. Dicho de otra manera, la expresión «operativamente unido» como se usa en este documento se refiere a la relación funcional de las secuencias de ácidos nucleicos con secuencias de nucleótidos reguladoras, tales como promotores, potenciadores, sitios de detención de la transcripción y traducción, y otras secuencias señal. Por ejemplo, la unión operativa de secuencias de ácido nucleico, típicamente ADN, a una secuencia reguladora o región promotora se refiere a la relación física y funcional
20 entre el ADN y la secuencia reguladora o promotor de modo que la transcripción de dicho ADN se inicie a partir de la secuencia reguladora o promotora, por una ARN polimerasa que específicamente reconoce, se une y transcribe el ADN. Con el fin de optimizar la expresión y/o la transcripción *in vitro*, puede ser necesario modificar la secuencia reguladora para la expresión del ácido nucleico o ADN en el tipo de célula para el que se expresa. La conveniencia de, o la necesidad de, dicha modificación se puede determinar empíricamente. Un polinucleótido operativamente
25 unido que se va a expresar incluye típicamente una señal de inicio adecuada (por ejemplo, ATG) y mantiene el marco de lectura correcto para permitir la expresión de la secuencia de polinucleótido bajo el control de la secuencia de control de expresión y la producción del polipéptido deseado codificado por la secuencia de polinucleótido.

[0207] Como se usa en este documento, los términos «promotor» o «región promotora» o «elemento promotor» se han definido en este documento, y se refieren a un segmento de una secuencia de ácido nucleico, típicamente pero no limitada a ADN o ARN o análogos del mismo, que controla la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que está operativamente unida. La región promotora incluye secuencias específicas que son suficientes para el reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Esta parte de la región promotora se denomina promotor. Además, la región promotora incluye secuencias que modulan esta actividad de
35 reconocimiento, unión e inicio de la transcripción de la ARN polimerasa. Estas secuencias pueden ser factores que actúan en cis o pueden responder a los que actúan en trans. Los promotores, dependiendo de la naturaleza de la regulación, pueden ser constitutivos o regulados.

[0208] La expresión «secuencias reguladoras» se usa de forma intercambiable con «elementos reguladores»
45 en este documento y se refiere de un elemento a un segmento de ácido nucleico, típicamente pero no limitado a, ADN o ARN o análogos del mismo, que modula la transcripción de la secuencia de ácido nucleico a la que está operativamente unido, y así actúan como moduladores transcripcionales. Las secuencias reguladoras modulan la expresión del gen y/o la secuencia de ácido nucleico a la que están operativamente unidas. La secuencia reguladora a menudo comprende «elementos reguladores» que son secuencias de ácido nucleico que son dominios de unión
50 de transcripción y son reconocidos por los dominios de unión a ácido nucleico de proteínas transcripcionales y/o factores de transcripción, represores o potenciadores, etc. Las secuencias reguladoras típicas incluyen, pero no se limitan a, promotores de la transcripción, promotores inducibles y elementos de transcripción, una secuencia operativa opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión de ARNm ribosómico adecuados, y secuencias para controlar la terminación de la transcripción y/o traducción. En la expresión
55 «elementos reguladores» se incluyen secuencias de ácidos nucleicos, tales como señales de inicio, potenciadores y promotores, que inducen o controlan la transcripción de secuencias codificantes de proteínas con las que están operativamente unidas. En algunos ejemplos, la transcripción de un gen recombinante está bajo el control de una secuencia promotora (u otra secuencia reguladora de la transcripción) que controla la expresión del gen recombinante en un tipo de célula en el que se pretende la expresión. También se entenderá que el gen

recombinante puede estar bajo el control de secuencias reguladoras de la transcripción que son las mismas o que son diferentes de las secuencias que controlan la transcripción de la forma natural de una proteína. En algunos casos, la secuencia promotora es reconocida por la maquinaria sintética de la célula, o maquinaria sintética introducida, requerida para iniciar la transcripción de un gen específico.

5

[0209] Las secuencias reguladoras pueden ser una única secuencia reguladora o secuencias reguladoras múltiples, o secuencias reguladoras modificadas o fragmentos de las mismas. Las secuencias reguladoras modificadas son secuencias reguladoras en las que la secuencia de ácido nucleico se ha cambiado o modificado por algún medio, por ejemplo, pero no limitado a, mutación, metilación, etc.

10

[0210] Las secuencias reguladoras útiles en los procedimientos como se describen en este documento son elementos promotores que son suficientes para hacer que la expresión génica dependiente del promotor sea controlable para el tipo de célula específico, tejido específico o inducible por señales o agentes externos (p. ej., potenciadores o represores); dichos elementos pueden estar ubicados en las regiones 5' o 3' del gen natural, o

15

[0211] Como se usa en este documento, la expresión «promotor específico de tejido» significa una secuencia de ácido nucleico que sirve como promotor, es decir, regula la expresión de una secuencia de ácido nucleico seleccionada operativamente unida al promotor, y que afecta selectivamente a la expresión de la secuencia de ácido nucleico seleccionada en células específicas de un tejido.

20

[0212] En algunas realizaciones, puede ser ventajoso dirigir la expresión de uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, de una manera específica de tejido o célula. La expresión específica de músculo se puede lograr, por ejemplo, usando el promotor de MKC de

25

músculo esquelético (como se describe en la solicitud de patente de EE.UU. WO2007/100722), u otros promotores específicos de músculo, tales como la cadena pesada de α -miosina, cadena ligera de miosina-2 (que es específica para el músculo esquelético (Shani y col., *Nature*, 314; 283-86, 1985), región de control del gen de la hormona liberadora gonadotrófica que está activa en el hipotálamo (Mason y col., *Science*, 234; 1372-78, 1986), y el promotor de músculo liso SM22a, que son todos comúnmente conocidos en la técnica.

30

[0213] La expresión «promotor constitutivamente activo» se refiere a un promotor de un gen que es expresado en todo momento dentro de una célula dada. Los ejemplos de promotores para usar en células de mamífero incluyen citomegalovirus (CMV), y para usar en células procariotas incluyen los promotores de bacteriófago T7 y T3, y similares. La expresión «promotor inducible» se refiere a un promotor de un gen que puede expresarse en respuesta a una señal dada, por ejemplo, la adición o reducción de un agente. Los ejemplos no limitantes de un promotor inducible son promotores «tet-on» y «tet-off», o promotores que están regulados en un tipo de tejido específico.

35

[0214] Se usan vectores víricos que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos. Por ejemplo, se puede usar un vector retrovírico (véase, Miller y col., *Meth. Enzymol.* 217: 581-599 (1993)). Estos vectores retrovíricos contienen los componentes necesarios para el empaquetamiento correcto del genoma vírico y la integración en el ADN de la célula hospedante. Se pueden encontrar más detalles sobre los vectores retrovíricos en Boesen y col., *Biotherapy* 6: 291-302 (1994), que describe el uso de un vector retrovírico para administrar el gen mdrl a citoblastos hematopoyéticos con el fin de hacer que los citoblastos sean más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovíricos en terapia génica son: Clowes y col., *J. Clin. Invest.* 93: 644-651 (1994); Kiem y col., *Blood* 83: 1467-1473 (1994); Salmons y Gunzberg, *Human Gene Therapy* 4: 129-141 (1993); y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.* 3: 110 - 114 (1993).

45

[0215] La producción de un vector retrovírico recombinante que porta un gen de interés se logra típicamente en dos etapas. Primero, la secuencia que codifica uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se puede insertar en un vector retrovírico que contiene las secuencias necesarias para la expresión eficaz de los reguladores metabólicos (incluyendo promotor y/o elementos potenciadores que pueden ser proporcionados por las repeticiones terminales largas (LTR) víricas o por un promotor/potenciador interno y señales de empalme relevantes), secuencias requeridas para el empaquetamiento eficaz del ARN vírico en viriones infecciosos (p. ej., una señal de empaquetamiento (Psi), un sitio de unión al cebador ARNt (-PBS), una secuencia reguladora en 3' requerida para la transcripción inversa (+PBS) y LTR víricas). Las LTR contienen secuencias requeridas para la asociación del ARN genómico vírico, la transcriptasa inversa y las funciones integrasa, y las secuencias implicadas en la dirección de la expresión del ARN genómico que se va a

55

empaquetar en partículas víricas.

[0216] Después de la construcción del vector retrovírico recombinante, el ADN del vector se introduce en una línea celular de empaquetamiento. Las líneas celulares de empaquetamiento proporcionan proteínas víricas requeridas en trans para el empaquetamiento de ARN genómico vírico en partículas víricas que tienen la variedad de hospedante deseado (p. ej., las proteínas núcleo (gag), polimerasa (pol) y envoltura (env) codificadas por el virus). La variedad de hospedante está controlada, en parte, por el tipo de producto del gen de la envuelta expresado en la superficie de la partícula vírica. Las líneas celulares de empaquetamiento pueden expresar productos de genes de la envuelta ecotrópicos, anfotrópicos o xenotrópicos. Alternativamente, la línea celular de empaquetamiento puede carecer de secuencias que codifiquen una proteína de la envuelta vírica (env). En este caso, la línea celular de empaquetamiento puede empaquetar el genoma vírico en partículas que carecen de una proteína asociada a la membrana (p. ej., una proteína env). Para producir partículas víricas que contienen una proteína asociada a membrana que permite la entrada del virus en una célula, la línea celular de empaquetamiento que contiene las secuencias retrovíricas se puede transfectar con secuencias que codifican una proteína asociada a membrana (p. ej., la proteína G del virus de la estomatitis vesicular VSV)). La célula de empaquetamiento transfectada puede producir entonces partículas víricas que contienen la proteína asociada a la membrana expresada por la línea celular de empaquetamiento transfectada; se dice que estas partículas víricas que contienen ARN genómico vírico derivado de un virus encapsulado por las proteínas de la envuelta de otro virus son partículas de virus pseudotipadas.

[0217] Los adenovirus son otros vectores víricos que se pueden usar en la terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes al epitelio respiratorio. Los adenovirus infectan naturalmente el epitelio respiratorio donde causan una enfermedad leve. Otros objetivos para los sistemas de suministro basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, las células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development* 3: 499-503 (1993) presentan una revisión de la terapia génica basada en adenovirus. Bout y col., *Human Gene Therapy* 5: 3-10 (1994) demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes al epitelio respiratorio de los monos rhesus. Otro vector vírico preferido es un virus de la viruela, tal como un virus vaccinia, por ejemplo, un virus vaccinia atenuado tal como el virus modificado de Ankara (MVA) o NYVAC, un virus de la viruela aviar, tal como la viruela de aves de corral o la viruela del canario. Otros casos del uso de adenovirus en la terapia génica se pueden encontrar en Rosenfeld y col., *Science* 252: 431 - 434 (1991); Rosenfeld y col., *Cell* 68: 143 - 155 (1992); Mastrangeli y col., *J. Clin. Invest.* 91: 225 - 234 (1993); publicación PCT WO94/12649; y Wang, et al., *Gene Therapy* 2: 775-783 (1995) En otra realización, se usan vectores lentivíricos, tales como los vectores basados en VIH descritos en las patentes de EE.UU. n.º 6.143.520; 5.665.557; y 5.981.276. También se contempla el uso de vectores de virus adenoasociados (AAV) (Walsh y col., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 204: 289-300 (1993); y patente de EE.UU. n.º 5.436.146).

[0218] Otro procedimiento para la terapia génica implica la transferencia de un gen a células en cultivo tisular mediante procedimientos, tales como la electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato de calcio o infección vírica. Habitualmente, el procedimiento de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Después, las células se seleccionan para aislar aquellas células que han absorbido y están expresando el gen transferido. Esas células después se suministran a un paciente.

[0219] La patente de EE.UU. n.º 5.676.954 describe la inyección de material genético, complejo con vehículos liposómicos catiónicos, en ratones. Las patentes de EE.UU. n.º 4.897.355, 4.946.787, 5.049.386, 5.459.127, 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional n.º: WO 94/9469, proporcionan lípidos catiónicos para usar en la transfección de ADN en células y mamíferos. Las patentes de EE.UU. n.º 5.589.466, 5.693.622, 5.580.859, 5.703.055, y la publicación internacional n.º: WO 94/9469 proporcionan procedimientos para suministrar complejos lipídicos catiónicos de ADN a mamíferos. Dichos complejos lipídicos catiónicos o nanopartículas también se pueden usar para suministrar proteínas.

[0220] Se puede introducir un gen o secuencia de ácido nucleico en una célula objetivo mediante cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, uno o más péptidos como se describen en la presente invención o sus construcciones mutantes, variantes, análogos o derivados de los mismos, se pueden introducir en una célula mediante transfección (p. ej., transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE-dextrano), lipofección, electroporación, microinyección (p. ej., mediante inyección directa de ADN desnudo), biolística, infección con un vector vírico que contiene un transgén relacionado con músculo, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosoma, transferencia génica mediada por microcélula, transferencia nuclear y similares. Un ácido nucleico que codifica uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de

los mismos, se puede introducir en las células mediante electroporación (véase, p. ej., Wong y Neumann, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 584 - 87 (1982)) y biolística (p. ej., una pistola de genes; Johnston y Tang, *Methods Cell Biol.* 43 Pt A: 353-65 (1994); Fynan y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 11478-82 (1993)).

5 **[0221]** Un gen o secuencia de ácido nucleico que codifica uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, se puede introducir en células objetivo mediante transfección o lipofección. Los agentes adecuados para la transfección o lipofección incluyen, por ejemplo, fosfato cálcico, DEAE dextrano, lipofectina, lipfectamina, DIMRIE C, Superfect y Effectin (Qiagen), unifactina, maxifactina, DOTMA, DOGS (Transfectam, dioctadecilamidoglicilespermina), DOPE (1,2-dioleoil-sn-glicero-3-
10 fosfoetanolamina), DOTAP (1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano), DDAB (bromuro de dimetildioctadecilamonio), DHDEAB (bromuro de N,N-di-n-hexadecil-N,N-dihidroxi-etil-amonio), HDEAB (bromuro de N-n-hexadecil-N,N-dihidroxi-etilamonio), polibreno, poli (etilenimina) (PEI) y similares. (Véase, por ejemplo, Banerjee y col, *Med. Chem.* 42: 4292-99 (1999); Godbey et al., *Gene Ther.* 6: 1380-88 (1999); Kichler y col., *Gene Ther.* 5: 855-60 (1998); Birchaa y otros, *J. Pharm.* 183: 195-207 (1999)).

15

[0222] Los procedimientos conocidos en la técnica para el suministro terapéutico de agentes, tales como proteínas y/o ácidos nucleicos se pueden usar para el suministro de un polipéptido o ácido nucleico que codifica uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, por ejemplo, transfección celular, terapia génica, administración directa con un vehículo de suministro o vehículo farmacéuticamente aceptable, suministro indirecto proporcionando células recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un polipéptido de fusión dirigido de la invención.

20

[0223] Se conocen diferentes sistemas de suministro y se pueden usar para administrar directamente polipéptidos terapéuticos, tales como el uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, y/o un ácido nucleico que codifica uno o más péptidos como se describen en este documento o mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, p. ej., encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el compuesto y endocitosis mediada por receptor (véase, por ejemplo, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262: 4429-4432). Los procedimientos de introducción pueden ser enterales o parenterales e incluyen, pero no se limitan a, vía intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural y oral. Los agentes se pueden administrar por cualquier vía conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

25

30

[0224] Puede ser conveniente administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en el área que necesita tratamiento; esto puede lograrse, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. ej., por inyección, por medio de un catéter, o mediante un implante, siendo el implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, que incluye membranas, como membranas sialásticas, fibras o sustitutos comerciales de la piel.

35

40

[0225] El agente activo se puede suministrar en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) *Science* 249: 1527-1533). En otra realización más, el agente activo se puede suministrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer (1990), véase antes). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase, Howard et al. (1989) *J. Neurosurg.* 71:105).

45

[0226] Por lo tanto, en la técnica se conoce una amplia variedad de vectores y construcciones de transferencia génica/terapia génica. Estos vectores se adaptan fácilmente para su uso en los procedimientos descritos en este documento. Mediante la manipulación adecuada usando técnicas de biología molecular/ADN recombinante para insertar un segmento de ácido nucleico que codifica un polipéptido operativamente unido en el vector de expresión/suministro seleccionado, se pueden generar muchos vectores equivalentes para la práctica de los procedimientos descritos en este documento.

50

Otras realizaciones

[0227] La descripción también contempla un artículo de fabricación que es un recipiente etiquetado para proporcionar el uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos. Un artículo de fabricación comprende material de envasado y un agente farmacéutico del uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, contenido dentro del material de envasado.

[0228] El agente farmacéutico en un artículo de fabricación es cualquiera de las composiciones de la presente invención adecuadas para proporcionar el uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos y formulado en una forma farmacéuticamente aceptable como se describe en este documento según las indicaciones descritas. Por lo tanto, la composición puede comprender el uno o más péptidos como se describen en este documento o un mutante, variante, análogo o derivado de los mismos, o una molécula de ADN que es capaz de expresar dicho péptido.

[0229] El artículo de fabricación contiene una cantidad de agente farmacéutico suficiente para usar en el tratamiento de una afección indicada en este documento, en dosis unitarias o múltiples. El material de envasado comprende una etiqueta que indica el uso del agente farmacéutico contenido en el mismo.

[0230] La etiqueta puede incluir además instrucciones de uso e información relacionada, según se requiera para la comercialización. El material de envasado puede incluir recipiente(s) para el almacenamiento del agente farmacéutico.

[0231] Como se usa en el presente documento, la expresión material de envasado se refiere a un material tal como vidrio, plástico, papel, papel de aluminio y similares, capaces de mantener dentro de medios fijos un agente farmacéutico. Así, por ejemplo, el material de envasado puede ser viales de plástico o de vidrio, sobres laminados y recipientes similares usados para contener una composición farmacéutica que incluye el agente farmacéutico.

[0232] En realizaciones preferidas, el material de envasado incluye una etiqueta que es una expresión tangible que describe los contenidos del artículo de fabricación y el uso del agente farmacéutico contenido en el mismo.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Ensayo del potencial antiinflamatorio en un modelo de septicemia de ratón

[0233] Se ensayó la capacidad de los fármacos peptídicos para determinar su potencial para la reducción de citoquinas inflamatorias después del tratamiento con lipopolisacárido bacteriano purificado (LPS), un componente principal de la pared celular bacteriana de bacterias Gram negativas. Se usó un modelo de inflamación en el que se inyectó LPS a los ratones, lo que indujo una respuesta inmunitaria transitoria y un aumento de las citoquinas inflamatorias en el suero. La respuesta inmunitaria alcanza su máximo después de 90 minutos y se desvanece después de 24 horas. Se compararon los niveles de marcadores inflamatorios séricos clave entre ratones tratados y no tratados con LPS 90 minutos después de inyección.

[0234] Se diseñaron 18 péptidos diferentes basados en la secuencia de hAAT (n.º de acceso AAB59371), y se sintetizaron usando la química de FMOC convencional. Para evaluar el potencial antiinflamatorio y terapéutico *in vivo*, los péptidos se ensayaron en un modelo de ratón de exposición a lipopolisacáridos (LPS) con niveles de TNF α en el suero como lecturas. Usando dexametasona como referencia, se inyectó por vía IP a grupos de 3 animales 0,2 mg/kg de péptido 2 horas antes de una exposición a LPS, y los niveles de TNF α en el suero se determinaron 30 min después de la exposición a LPS, mediante ELISA. El péptido de mejor rendimiento redujo los niveles en el suero de TNF α de forma equivalente a los alcanzados con 1 mg/kg de dexametasona. A continuación, se sintetizaron las versiones acortadas de este péptido, se ensayaron en el modelo de exposición a LPS de ratón, y un péptido de 17 aminoácidos, SP16, surgió como un compuesto candidato de desarrollo para una caracterización adicional. A continuación, se ensayó SP16 en un modelo de endotoxemia letal, que es un molde de endotoxemia después de exposición a radiación aguda, donde las bacterias Gram negativas que se escapan del sistema gastrointestinal pueden causar endotoxemia letal. En este experimento, el tratamiento con péptido mejoró la supervivencia (figura 7). *In vitro*, SP16 disminuye la activación de NF κ B inducida por LPS en linfocitos THP1, en consonancia con el efecto antiinflamatorio *in vivo*.

[0235] Se inyectó a ratones 0,5, 0,1, 0,02 y 0,004 mg de cada péptido. Los ratones también se trataron con dexametasona como control positivo y vehículo como control negativo. Dos horas más tarde, a cada ratón se le inyectó LPS. Las muestras se tomaron 90 minutos después de la inyección de LPS.

[0236] Los resultados se muestran en las figuras 3 y 4. La figura 3 muestra los niveles de TNF- α en sangre de ratones a los que se inyectó cada cantidad de cada péptido. La figura 4 muestra solo los resultados para ratones a los que se inyectaron 0,004 mg de cada péptido.

[0237] Los resultados muestran que los péptidos descritos en este documento son eficaces para disminuir los niveles de TNF- α y, por lo tanto, son eficaces para reducir la inflamación en sujetos mamíferos.

5 *Ejemplo 2: péptidos por barrido de alanina en el modelo de septicemia en ratón*

[0238] Para evaluar el efecto de diferentes aminoácidos en el péptido SP16 en cuanto al efecto inmunomodulador, se creó un barrido de alanina. Los diferentes péptidos en el barrido de alanina se muestran en la tabla B. La figura 10 muestra que los péptidos sustituidos con alanina tanto N como C-terminales, donde los 3 aminoácidos más terminales se habían sustituido por alanina, perdieron la mayor parte de su capacidad para reducir los niveles de TNF- α . Los péptidos en los que la sustitución se produjo dentro de los aminoácidos 4-14 de SP16, parecían mantener y más bien mejorar su capacidad para reducir los niveles de TNF- α en comparación con la dexametasona de control. El modelo de ratón de LPS es un modelo establecido para la septicemia en seres humanos y, por lo tanto, se concluye que los péptidos en los que están presentes los aminoácidos 1-3 y 15-17 se pueden usar eficazmente en seres humanos para tratar o prevenir la septicemia en afecciones, tales como quemados o radiación aguda, que expone a los seres humanos a un alto riesgo de desarrollar endotoxemia.

20 *Ejemplo 3. Ensayo del potencial antiinflamatorio en un moldeo de artritis inducida por anticuerpo contra colágeno (CAIA) de artritis reumatoide*

[0239] Se ensayó la capacidad de los fármacos peptídicos en cuanto a su potencial para reducir la inflamación y el edema de la pata en un modelo de artritis en ratón: el modelo CAIA. A los ratones Balb/c se les inyectó un cóctel de anticuerpos contra colágeno el día 0 y recibieron un refuerzo de LPS el día 3. Después del refuerzo de LPS, se puntuó la hinchazón de la pata para cada pata. Para los resultados mostrados en la figura 5, se administraron a los animales 0,2 mg/kg del péptido expuesto en la SEQ ID NO: 1 (también denominada SP16), diariamente. En la figura 6, se inyectó a los ratones Balb/c por vía intravenosa un cóctel de anticuerpos contra colágeno (MD BioSciences) el día 0 y se inyectó por vía intraperitoneal LPS el día 3. Se determinó la hinchazón de la pata los días 0, 3, 4, 5, 6 y 7, y la gráfica muestra las puntuaciones acumuladas para todas las patas de cada grupo experimental de 5 animales. El control no tratado no recibió el cóctel de CAIA o LPS. El grupo simulado recibió tanto el cóctel de anticuerpos como el refuerzo de LPS. La dexametasona se administró diariamente en 1 mg/kg. El péptido expuesto en SEQ ID NO: 1 se disolvió en agua y se administró por vía intraperitoneal, en 0,6 mg/kg al día, o una dosis única de 0,6 mg/kg el día 3.

[0240] La figura 9 muestra la eficacia de SP16 en el modelo CAIA de ratón de RA preclínico. La gráfica resume los datos de un estudio en el modelo CAIA de RA de ratón. La gráfica muestra las puntuaciones de hinchazón acumulada para todas las patas en el pico de la enfermedad (día 7) para grupos de 5 animales. Se inyectó a ratones Balb/c por vía intravenosa un cóctel de anticuerpos contra colágeno (MD Biosciences) el día 0 y se inyectó por vía intraperitoneal LPS el día 3. Los animales de control normales no recibieron inyecciones y sirvieron como control de valores de referencia libres de enfermedad. Se muestra que la inyección diaria de SP16 proporcionó una protección equivalente a la dexametasona.

[0241] Como se muestra en las figuras 5, 6 y 9, el péptido: VKFNKPFVFLMIEQNTK (SEQ ID NO: 1) es un agente antiinflamatorio y/o inmunomodulador eficaz en el modelo de septicemia.

45 *Ejemplo 4: SP16 mejora el control glucémico en el modelo de db/db de diabetes tipo II*

[0242] Alentados por los datos de septicemia y RA, planteamos la hipótesis de si SP16 protegería a los ratones db/db, un modelo de diabetes tipo II (T2DM), de la pérdida de células β inducida por gluco y lipotoxicidad y de la menor resistencia a la insulina (25, 39). Para ensayar esta hipótesis, se diseñó y realizó un estudio en animales db/db. Se comenzó un estudio en el modelo db/db de T2DM porque es más fácil de manejar (debido al inicio regulado y sincronizado de la diabetes manifiesta) y, por lo tanto, más rentable que un estudio en ratones NOD.

[0243] En el modelo db/db, el tratamiento con SP16 dio como resultado menores niveles de glucosa y HbA1c en sangre no en ayunas, mayores niveles de péptido C y una tolerancia a la glucosa mejorada (figura 8). La glucosa en sangre no en ayunas y la tolerancia a la glucosa mejoraron frente al grupo de control de vehículo, aunque el grupo de rosiglitazona mostró mejores valores que el grupo de SP16. En conjunto, estos datos muestran que el tratamiento con SP16 mejoró el control glucémico en un modelo establecido de diabetes tipo II.

[0244] Estos datos, junto con los resultados de septicemia y RA, muestran que SP16 tiene las propiedades

antiinflamatorias e inmunomoduladoras de la proteína parental hAAT, proporcionando así una forma de tratamiento mucho más rentable, ya que el tamaño del fragmento de péptido recién descubierto es significativamente más pequeño que el de hATT.

5 *Ejemplo 5: el péptido SP16 es un agonista del receptor 2 de tipo Toll*

[0245] El receptor 2 tipo toll (TLR-2) tiene una función en el sistema inmunitario y es un miembro de la familia de receptores tipo toll (TLR), que tienen una función fundamental en el reconocimiento de patógenos y la activación de la inmunidad innata. El gen de TLR-2 se expresa de forma más abundante en leucocitos de sangre periférica, y se ha mostrado que media la respuesta del hospedante a bacterias Gram positivas y levaduras a través de la estimulación de NF-kappaB.

[0246] Nuestros datos de líneas celulares genéticamente modificadas muestran que SP16 activa la ruta de señalización de TLR-2, pero no la señalización de TLR-4. Esto es interesante porque otro péptido inmunomodulador, DiaPep277, que no comparte similitud de secuencia con SP16, tiene un perfil de activación de TLR similar. Sin querer estar sujetos a ninguna teoría, basándose en estas observaciones, sugerimos que SP16 actúa a través del receptor TLR2, y, posiblemente, el receptor de linfocitos T, para conducir la secreción de citoquinas a un perfil de citoquinas antiinflamatorias Th2 (IL-4 e IL-10). En las enfermedades autoinmunitarias, se predice que SP16 induce el aumento de las poblaciones de linfocitos T reguladores y, de ese modo, cambia la respuesta inflamatoria hacia una respuesta reguladora.

[0247] Específicamente, la figura 11 muestra que SP16 es un agonista de TLR2. La gráfica resume los datos de un experimento con una línea celular de indicador TLR-2 genéticamente modificada (HEK-BLUE™ mTLR2, Invivogen). Las células se incubaron con las concentraciones indicadas de péptido durante 24 horas. Tras la activación de TLR2, las células secretan fosfatasa alcalina que se puede analizar. El ensayo se realizó por triplicado y se representan gráficamente las medias con las desviaciones estándar. SP16 presentaba propiedades de ligando de TLR-2, induciendo la señalización de TLR-2 de una manera dependiente de la dosis. El péptido de control desordenado (SP34) no mostró inducción de TLR2. *p<0,05, comparado con el control desordenado (SP34).

[0248] La figura 12 muestra el análisis de relación de actividad y estructura para SP16. La gráfica resume los datos de un experimento en el que se usó una línea celular indicadora de TLR-2 genéticamente modificada (HEK-Blue™ mTLR2, Invivogen) para ensayar el impacto de la sustitución de restos de aminoácidos del péptido SP16 por alanina («barrido de alanina»). Las células se incubaron con 20 µg/ml de los péptidos indicados durante 24 horas. Tras la activación de TLR2, las células secretan fosfatasa alcalina que se puede analizar. El ensayo se realizó por triplicado y se representan las medias. Las secuencias de péptidos se muestran en la siguiente figura. *p<0,05, comparado con el control desordenado (SP34).

[0249] La figura 13 muestra el análisis de relación de actividad y estructura para SP16. La tabla muestra las secuencias de aminoácidos de los péptidos que se ensayaron usando una línea celular indicadora de TLR-2 (véase datos en la figura 12). El lado derecho de la tabla resume el impacto de los péptidos en la señalización de TLR-2 (* indica bajo, ***** indica alto, N/A no tenía impacto en la señalización).

[0250] Los datos sugieren que los tres primeros restos contribuyen a inducir la señalización de TLR-2. Si los restos 1-3 se sustituyen por alaninas (SP37), el péptido mutante no tiene impacto sobre TLR2. Sin embargo, cuando se sustituyen individualmente (SP52-SP54), los péptidos retienen la capacidad de estimular TLR-2. Sorprendentemente, la sustitución del resto de fenilalanina en la posición 3 por un resto de alanina más pequeño potencia la capacidad de estimular la señalización de TLR-2 en comparación con SP16.

LISTA DE SECUENCIAS

50

[0251]

<110>SERPIN PHARMA, LLC

55 <120>PÉPTIDOS Y PROCEDIMIENTOS DE USO DE LOS MISMOS

<130>065292-074121

<140>

<141>

<150>61/699.571

<151>2012-09-11

5

<160>56

<170>PatentIn versión 3.5

<210>1

10 <211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>1

15

Val	Lys	Phe	Asn	Lys	Pro	Phe	Val	Phe	Leu	Met	Ile	Glu	Gln	Asn	Thr
1				5					10						15

Lys

<210>2

<211>17

20 <212>PRT

<213>Secuencia artificial

<220>

<221>fuente

25 <223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: secuencia de consenso sintética"

<220>

<221>VARIANT

<222>(1)..(1)

30 <223>/sustituir = "Leu"

<220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(1)

35 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<220>

<221>MOD_RES

40 <222>(2)..(2)

<223>Cualquier aminoácido

<220>

<221>VARIANT

45 <222>(8)..(8)

<223>/sustituir = "Leu" o "Met"

<220>

<221>misc_feature

50 <222>(8)..(8)

<223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

<220>
 <221>MOD_RES
 <222>(9)..(10)
 <223>Cualquier aminoácido
 5
 <220>
 <221>VARIANT
 <222>(11)..(11)
 <223>/sustituir = "Ile" o "Val"
 10
 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(11)..(11)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para
 15 dicha posición"
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(12)..(16)
 20 <223>Cualquier aminoácido
 <400>2

	Val	Xaa	Phe	Asn	Lys	Pro	Phe	Val	Xaa	Xaa	Met	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa	Xaa
1					5					10						15

Gln

 25
 <210>3
 <211>17
 <212>PRT
 <213>Secuencia artificial
 30
 <220>
 <221>fuente
 <223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: secuencia de consenso sintética"
 35 <220>
 <221>VARIANT
 <222>(1)..(1)
 <223>/sustituir = "Leu"
 40 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(1)..(1)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha
 posición"
 45
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(2)..(2)
 <223>Cualquier aminoácido
 50
 <220>
 <221>VARIANT
 <222>(5)..(5)

<223>/sustituir = "Arg"

<220>
 <221>misc_feature
 5 <222>(5)..(5)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

<220>
 10 <221>VARIANT
 <222>(8)..(8)
 <223>/sustituir = "Leu" o "Met"

<220>
 15 <221>misc_feature
 <222>(8)..(8)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

20 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(9)..(10)
 <223>Cualquier aminoácido

25 <220>
 <221>VARIANT
 <222>(11)..(11)
 <223>/sustituir = "Ile" o "Val"

30 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(11)..(11)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"

35 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(12)..(16)
 <223>Cualquier aminoácido

40 <220>
 <221>VARIANT
 <222>(17)..(17)
 <223>/sustituir = "Gln"

45 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(17)..(17)
 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"

50 <400>3

Val Xaa Phe Asn Lys Pro Phe Val Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 1 5 10 15

Lys

<210>4
 <211>8
 5 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>4

Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Arg
 1 5

10
 <210>5
 <211>8
 <212>PRT
 15 <213>Homo sapiens
 <400>5

Arg Phe Asn Lys Pro Phe Leu Arg
 1 5

20
 <210>6
 <211>28
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 25
 <220>
 <221>MOD_RES
 <222>(1)..(10)
 <223>Cualquier aminoácido básico
 30
 <220>
 <221>misc_feature
 <222>(1)..(10)
 <223>/nota = "Esta región puede abarcar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y
 35 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos"

<220>
 <221>MOD_RES
 <222>(19)..(28)
 40 <223>Cualquier aminoácido básico

<220>
 <221>misc_feature
 <222>(19)..(28)
 45 <223>/nota = "Esta región puede abarcar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y
 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos"

<220>

<221>fuente

<223>/nota = "véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas"

5

<400>6

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Asn Arg Pro Phe
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

10 <210>7

<211>28

<212>PRT

<213>Homo sapiens

15 <220>

<221>MOD_RES

<222>(1)..(10)

<223>Cualquier aminoácido básico

20 <220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(10)

<223>/nota = "Esta región puede abarcar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos"

25

<220>

<221>MOD_RES

<222>(19)..(28)

<223>Cualquier aminoácido básico

30

<220>

<221>misc_feature

<222>(19)..(28)

<223>/nota = "Esta región puede abarcar 1, 2, 3, 4, 5, 6, 6, 7, 8, 9, 10 o entre 1 y 3, entre 1 y 5, entre 1 y 6, entre 1 y 7, entre 1 y 8, entre 1 y 9, o entre 1 y 10 aminoácidos básicos"

35

<220>

<221>fuente

<223>/nota = " véase la memoria descriptiva presentada para una descripción detallada de las sustituciones y las realizaciones preferidas"

40

<400>7

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Phe Asn Lys Pro Phe
1 5 10 15

Leu Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

45

<210>8

ES 2 676 028 T3

<211>12
<212>PRT
<213>Homo sapiens

5 <400>8

Arg Arg Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10

<210>9
10 <211>12
<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>9
15

Arg Arg Arg Phe Asn Lys Pro Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10

<210>10
<211>6
20 <212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>10

Phe Asn Arg Pro Phe Leu
1 5

25

<210>11
<211>6
<212>PRT
30 <213>Homo sapiens

<400>11

Phe Asn Lys Pro Phe Leu
1 5

35

<210>12
<211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens

40

<400>12

Ala Ala Ala Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
1 5 10 15

Lys

ES 2 676 028 T3

<210>13
<211>17
<212>PRT
5 <213>Homo sapiens
<400>13

Val Lys Phe Ala Ala Ala Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
1 5 10 15

Lys

10
<210>14
<211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens
15 <400>14

Val Lys Phe Asn Lys Pro Ala Ala Ala Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
1 5 10 15

Lys

<210>15
20 <211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>15
25

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Ala Ala Ala Glu Gln Asn Thr
1 5 10 15

Lys

<210>16
<211>17
30 <212>PRT
<213>Homo sapiens
<400>16

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Ala Ala Ala Thr
1 5 10 15

Lys

35
<210>17

ES 2 676 028 T3

<211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens

5 <400>17

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Ala Ala
1 5 10 15

Ala

<210>18
10 <211>36
<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>18
15

Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met
1 5 10 15

Ile Glu Gln Asn Thr Lys Ser Pro Leu Phe Met Gly Lys Val Val Asn
20 25 30

Pro Thr Gln Lys

<210>19
<211>39
20 <212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>19

Ser Ala Gln Thr Asn Arg His Ile Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu
1 5 10 15

Val Val Ile Phe Ser Thr Ser Thr Gln Ser Val Leu Phe Leu Gly Lys
20 25 30

Val Val Asp Pro Thr Lys Pro
35

25

<210>20
<211>40
<212>PRT
30 <213>Homo sapiens

<400>20

ES 2 676 028 T3

Ser Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe
1 5 10 15

Leu Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr Gln Asn Ile Phe Phe Met Ser
20 25 30

Lys Val Thr Asn Pro Lys Gln Ala
35 40

<210>21

<211>38

5 <212>PRT

<213>Rattus sp.

<400>21

Ser Gly Arg Pro Pro Met Ile Val Trp Phe Asn Arg Pro Phe Leu Ile
1 5 10 15

Ala Val Ser His Thr His Gly Gln Thr Ile Leu Phe Met Ala Lys Val
20 25 30

Ile Asn Pro Val Gly Ala
35

10

<210>22

<211>38

<212>PRT

15 <213>Rattus sp.

<400>22

Lys Ser Leu Pro Gln Thr Ile Pro Leu Leu Asn Phe Asn Arg Pro Phe
1 5 10 15

Met Leu Val Ile Thr Asp Asp Asn Gly Gln Ser Val Phe Phe Met Gly
20 25 30

Lys Val Thr Asn Pro Met
35

20

<210>23

<211>24

<212>PRT

<213>Secuencia artificial

25

<220>

<221>fuente
 <223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400>23
 5

Ser Ala Gln Val Glu Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val
 1 5 10 15

Ile Ile Val Ser Thr Asn Thr Gln
 20

<210>24
 <211>24
 10 <212>PRT
 <213>Secuencia artificial

<220>
 <221>fuente
 15 <223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400>24

Ser Ile Pro Pro Gln Met Ile Val Trp Phe Asn Arg Pro Phe Leu Ile
 1 5 10 15

Ala Ile Ser His Thr His Thr Gln
 20

20
 <210>25
 <211>22
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

25
 <400>25

Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met
 1 5 10 15

Ile Glu Gln Asn Thr Lys
 20

30 <210>26
 <211>25
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

<400> 26
 Ser Ala Gln Thr Asn Arg His Ile Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu
 1 5 10 15

35

ES 2 676 028 T3

<210>27
 <211>26
 <212>PRT
 5 <213>Homo sapiens
 <400>27

Ser Ala Leu Val Glu Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe
 1 5 10 15

Leu Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr Gln
 20 25

10
 <210>28
 <211>26
 <212>PRT
 <213>Rattus sp.
 15
 <400>28

Lys Ser Leu Pro Gln Thr Ile Pro Leu Leu Asn Phe Asn Arg Pro Phe
 1 5 10 15

Met Leu Val Ile Thr Asp Asp Asn Gly Gln
 20 25

20 <210>29
 <211>21
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 25 <400>29

Ile Pro Pro Glu Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile
 1 5 10 15

Glu Gln Asn Thr Lys
 20

<210>30
 30 <211>21
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens
 <400>30
 35 <210>31

ES 2 676 028 T3

Asn Arg His Ile Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe
1 5 10 15

Ser Thr Ser Thr Gln
20

<211>21
<212>PRT
5 <213>Homo sapiens

<400>31

Thr Arg Thr Ile Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile Val
1 5 10 15

Pro Thr Asp Thr Gln
20

10
<210>32
<211>21
<212>PRT
<213>Rattus sp.

15
<400>32

Thr Ile Pro Leu Leu Asn Phe Asn Arg Pro Phe Met Leu Val Ile Thr
1 5 10 15

Asp Asp Asn Gly Gln
20

20 <210>33
<211>11
<212>PRT
<213>Homo sapiens

25 <400>33

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met
1 5 10

<210>34
30 <211>22
<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>34
35

ES 2 676 028 T3

Ser Ile Pro Pro Glu Val Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Leu Met
 1 5 10 15

Ile Glu Gln Asn Thr Lys
 20

- <210>35
- <211>17
- 5 <212>PRT
- <213>Secuencia artificial
- <220>
- <221>fuente
- 10 <223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: secuencia de consenso sintética"
- <220>
- <221>VARIANT
- <222>(1)..(1)
- 15 <223>/sustituir = "Leu"
- <220>
- <221>misc_feature
- <222>(1)..(1)
- 20 <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquel en la anotación para dicha posición"
- <220>
- <221>MOD_RES
- 25 <222>(2)..(2)
- <223>Cualquier aminoácido
- <220>
- <221>VARIANT
- 30 <222>(8)..(8)
- <223>/sustituir = "Leu" o "Met"
- <220>
- <221>misc_feature
- 35 <222>(8)..(8)
- <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para dicha posición"
- <220>
- <221>MOD_RES
- 40 <222>(9)..(10)
- <223>Cualquier aminoácido
- <220>
- <221>VARIANT
- 45 <222>(11)..(11)
- <223>/sustituir = "Ile" o "Val"
- <220>
- <221>misc_feature
- 50 <222>(11)..(11)
- <223>/nota = "El resto dado en la secuencia no tiene preferencia con respecto a aquellos en las anotaciones para"

dicha posición"

<220>

<221>MOD_RES

5 <222>(12)..(16)

<223>Cualquier aminoácido

<400>35

Val Xaa Phe Asn Arg Pro Phe Val Xaa Xaa Met Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Gln

10

<210>36

<211>9

<212>PRT

15 <213>Homo sapiens

<400>36

Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr Lys
1 5

20

<210>37

<211>6

<212>PRT

<213>Secuencia artificial

25

<220>

<221>fuente

<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: marcador sintético 6xHis"

30 <400>37

His His His His His His
1 5

<210>38

35 <211>23

<212>PRT

<213>Homo sapiens

<400>38

40

Arg Arg Arg Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu
1 5 10 15

Gln Asn Thr Lys Arg Arg Arg
20

ES 2 676 028 T3

<210>39
<211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens
5
<400>39

Arg Arg Arg Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Arg Arg
1 5 10 15

Arg

10 <210>40
<211>17
<212>PRT
<213>Homo sapiens

15 <400>40

Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe Ser Thr Ser Thr
1 5 10 15

Gln

20 <210>41
<211>11
<212>PRT
<213>Homo sapiens

25 <400>41

Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val Val Ile
1 5 10

<210>42
30 <211>23
<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>42

35

Arg Arg Arg Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Phe Ser
1 5 10 15

Thr Ser Thr Gln Arg Arg Arg
20

<210>43
<211>17
40 <212>PRT

ES 2 676 028 T3

<213>Homo sapiens

<400>43

Arg Arg Arg Leu Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Val Val Ile Arg Arg
1 5 10 15

Arg

5

<210>44

<211>17

<212>PRT

10 <213>Homo sapiens

<400>44

Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile Val Pro Thr Asp Thr
1 5 10 15

Gln

15

<210>45

<211>11

<212>PRT

<213>Homo sapiens

20

<400>45

Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile
1 5 10

25 <210>46

<211>23

<212>PRT

<213>Homo sapiens

30 <400>46

Arg Arg Arg Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile Val Pro
1 5 10 15

Thr Asp Thr Gln Arg Arg Arg
20

<210>47

35 <211>17

<212>PRT

<213>Homo sapiens

ES 2 676 028 T3

<400>47

Arg Arg Arg Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Met Ile Ile Arg Arg
1 5 10 15

Arg

5

<210>48
<211>8
<212>PRT
<213>Homo sapiens

10

<400>48

Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu
1 5

15 <210>49

<211>14
<212>PRT
<213>Homo sapiens

20 <400>49

Arg Arg Arg Val Arg Phe Asn Arg Pro Phe Leu Arg Arg Arg
1 5 10

<210>50

25

<211>21
<212>PRT
<213>Homo sapiens

<400>50

30

Ile Pro Pro Glu Val Lys Ala Ala Ala Ala Ala Ala Phe Leu Met Ile
1 5 10 15

Glu Gln Asn Thr Lys
20

<210>51

<211>21

35

<212>PRT
<213>Secuencia artificial

<220>

<221>fuente

40

<223>/nota = "Descripción de la secuencia artificial: péptido sintético"

<400>51

Phe Pro Lys Met Val Pro Gln Phe Asn Thr Glu Leu Lys Ile Phe Pro
 1 5 10 15

Glu Val Asn Ile Lys
 20

5 <210>52
 <211>17
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

10 <400>52

Ala Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
 1 5 10 15

Lys

<210>53
 15 <211>17
 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

<400>53
 20

Val Ala Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
 1 5 10 15

Lys

<210>54
 <211>17
 25 <212>PRT
 <213>Homo sapiens

<400>54

Val Lys Ala Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
 1 5 10 15

Lys

30

<210>55
 <211>17
 <212>PRT

ES 2 676 028 T3

<213>Homo sapiens

<400>55

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Ala
1 5 10 15

5 Lys

<210>56

<211>17

<212>PRT

10 <213>Homo sapiens

<400>56

Val Lys Phe Asn Lys Pro Phe Val Phe Leu Met Ile Glu Gln Asn Thr
1 5 10 15

Ala

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende:
 - 5 un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos VKFNKPFVFLMIEQNTK (SEQ ID NO: 1); o
un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos VKFNKPFVFLMIEQNTK (SEQ ID NO: 1) combinada con la
secuencia de aminoácidos de un marcador de epítipo, un prolongador de la semivida o una combinación de los
mismos.
 - 10 2. La composición de la reivindicación 1, en la que el péptido consiste en la secuencia de aminoácidos
VKFNKPFVFLMIEQNTK (SEQ ID NO: 1) combinada con la secuencia de aminoácidos del marcador de epítipo, el
prolongador de la semivida o la combinación de los mismos.
 3. La composición de la reivindicación 2, en la que el marcador de epítipo, el prolongador de la semivida
15 o una combinación de los mismos, se une al péptido como un péptido de fusión.
 4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en la que el marcador de epítipo es biotina, un marcador
FLAG, c-myc, hemaglutinina, His6 (SEQ ID NO: 37), digoxigenina, FITC, Cy3, Cy5, proteína fluorescente verde,
20 marcadores de epítipo V5, GST, b-galactosidasa, AU1, AU5 o avidina y el prolongador de la semivida es uno de un
dominio Fc o albúmina de suero.
 5. La composición de la reivindicación 2, en la que el péptido comprende uno o más D-aminoácidos.
 6. La composición de cualquier reivindicación anterior, en la que la composición comprende además un
25 vehículo farmacéuticamente aceptable.
 7. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para usar en el tratamiento de la
diabetes tipo II, lupus, enfermedad de injerto contra huésped, uveítis, eccema, psoriasis, fibrosis quística, artritis
reumatoide, síndrome de radiación aguda, pacientes quemados, enfermedad inflamatoria intestinal o diabetes tipo I
30 de inicio reciente.
 8. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para usar en la mejora del control
glucémico en un sujeto que tiene hiperglucemia.
 - 35 9. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para usar en la reducción del riesgo de
endotoxemia en un sujeto expuesto a quemaduras o radiación.
 10. Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, para usar en el tratamiento de la
fibrosis quística en un sujeto.
40

Péptidos C-terminales de serpina	
AAT humana C36	1 S I P P E V K F N K P F V F L M I E Q N T K S P L F M G K V V N P T Q K
Callistatina humana (C39)	2 S A Q T N R H I L R F N R P F L V V I F S T S T Q S V L F L G K V V D P T K P
Antiquimiotripsina humana (C40)	3 S A L V E T R T I V R F N R P F L M I I V P T D T Q N I F F M S K V T N P K Q A
Serpina3M de rata (C38)	4 S G R P P M I V W F N R P P F L I A V S H T H G Q T I L F M A K V I N P V G A
Serpina3K de rata (C38)	5 K S L P Q T I P L L N F N R P P F M L V I T D D N G Q S V F F M G K V T N P M
Híbrido humano 1	6 S A Q V E T I V R F N R P P F L V I I V S T N T Q
Híbrido humano-rata 1	7 S I P P Q M I V W F N R P P F L I A I S H T H T Q

FIG. 1

Péptidos derivados por truncamiento

AAT humana C36	8	SIPPE	VKFNKPFVFLMIEQNTK
Calistatina humana (C39)	9	SAQTN RHI	LRFNRPFLVVI FSTSTQ
Antiquimiotripsina humana (C40)	10	ALVETRTI	VRFNRPFLMI VPTDTQ
Serpina3K de rata (C38)	11	SLPQTIPL	LNFRNRPFLVITDDNGQ
AAT humana C36	12	IPPE	VKFNKPFVFLMIEQNTK
Calistatina humana (C39)	13	NRHI	LRFNRPFLVVI FSTSTQ
Antiquimiotripsina humana (C40)	14	TRTI	VRFNRPFLMI VPTDTQ
Serpina3K de rata (C38)	15	TIPL	LNFRNRPFLVITDDNGQ
Secuencia de núcleo C36, larga	16		VKFNKPFVFLMIEQNTK
Secuencia de núcleo C36, corta	17		VKFNKPFVFLM
AAT humana C36	18	SIPPE	VKAAAAAFLMIEQNTK
AAT humana C36	19		VKFNKPFVFLMIEQNTK
AAT humana C36	20		VKFNKPFVFLM
AAT humana C36	21	RRRV	VKFNKPFVFLMIEQNTKRRR
AAT humana C36	22	RRRV	VKFNKPFVFLMRRR
Calistatina humana (C39)	23		LRFNRPFLVVI FSTSTQ
Calistatina humana (C39)	24		LRFNRPFLVVI
Calistatina humana (C39)	25	RRRL	LRFNRPFLVVI FSTSTQRRR
Calistatina humana (C39)	26	RRRL	LRFNRPFLVVI RRR
Antiquimiotripsina humana (C40)	27		VRFNRPFLMI VPTDTQ
Antiquimiotripsina humana (C40)	28		VRFNRPFLMI
Antiquimiotripsina humana (C40)	29	RRRV	VRFNRPFLMI VPTDTQRRR
Antiquimiotripsina humana (C40)	30	RRRV	VRFNRPFLMI RRR
Antiquimiotripsina humana (C40)	31		VRFNRPFL
Antiquimiotripsina humana (C40)	32	RRRV	VRFNRPFLRRR
AAT humana C36	33	IPPE	VKAAAAAFLMIEQNTK
Desordenado	34	FPKMVPQ	FNTELKIFPEVNIK
Núcleo	35		FNRPFL
Núcleo	36	RRRV	RRRVFNRPFLRRR

FIG. 2

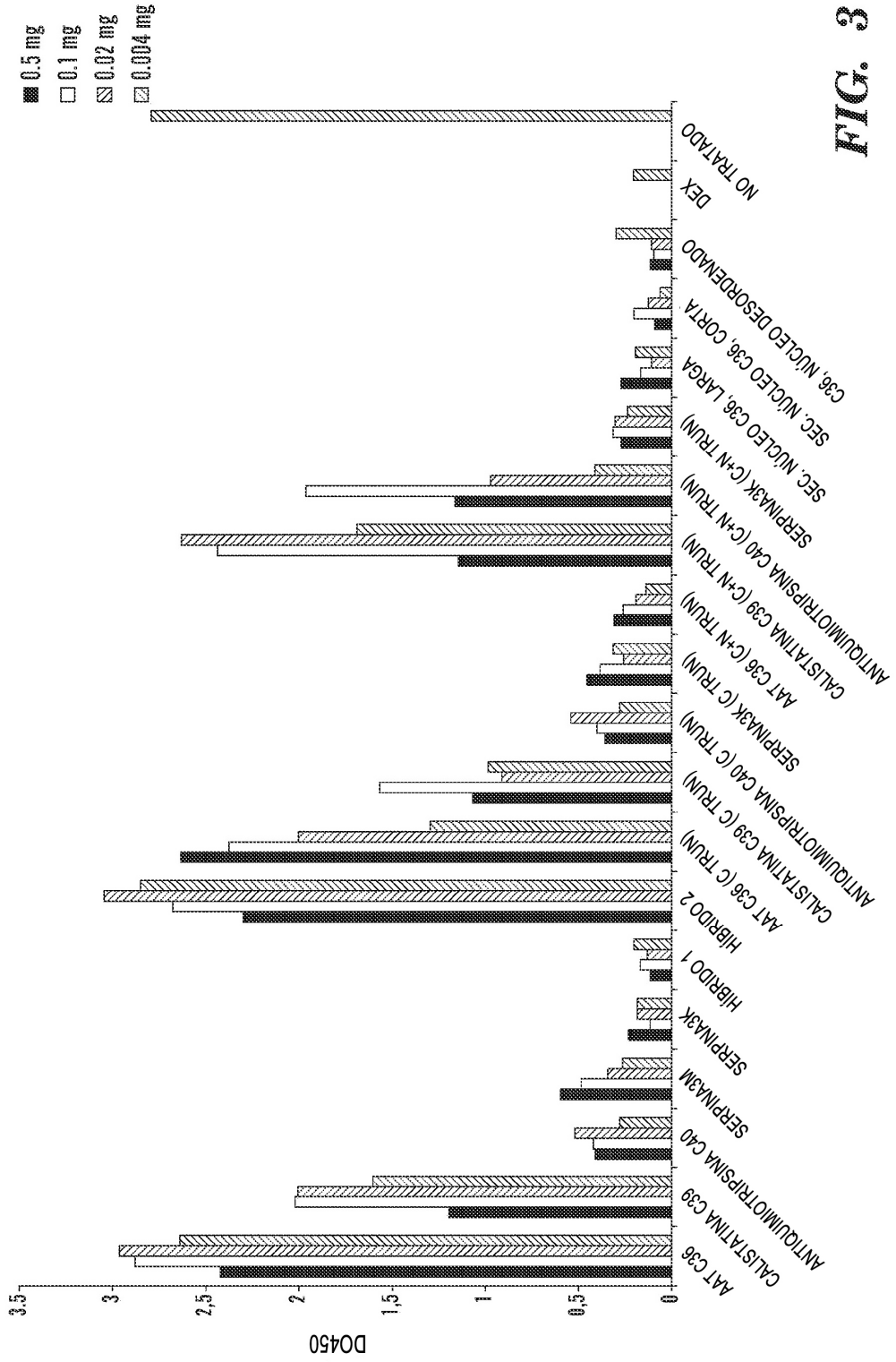


FIG. 3

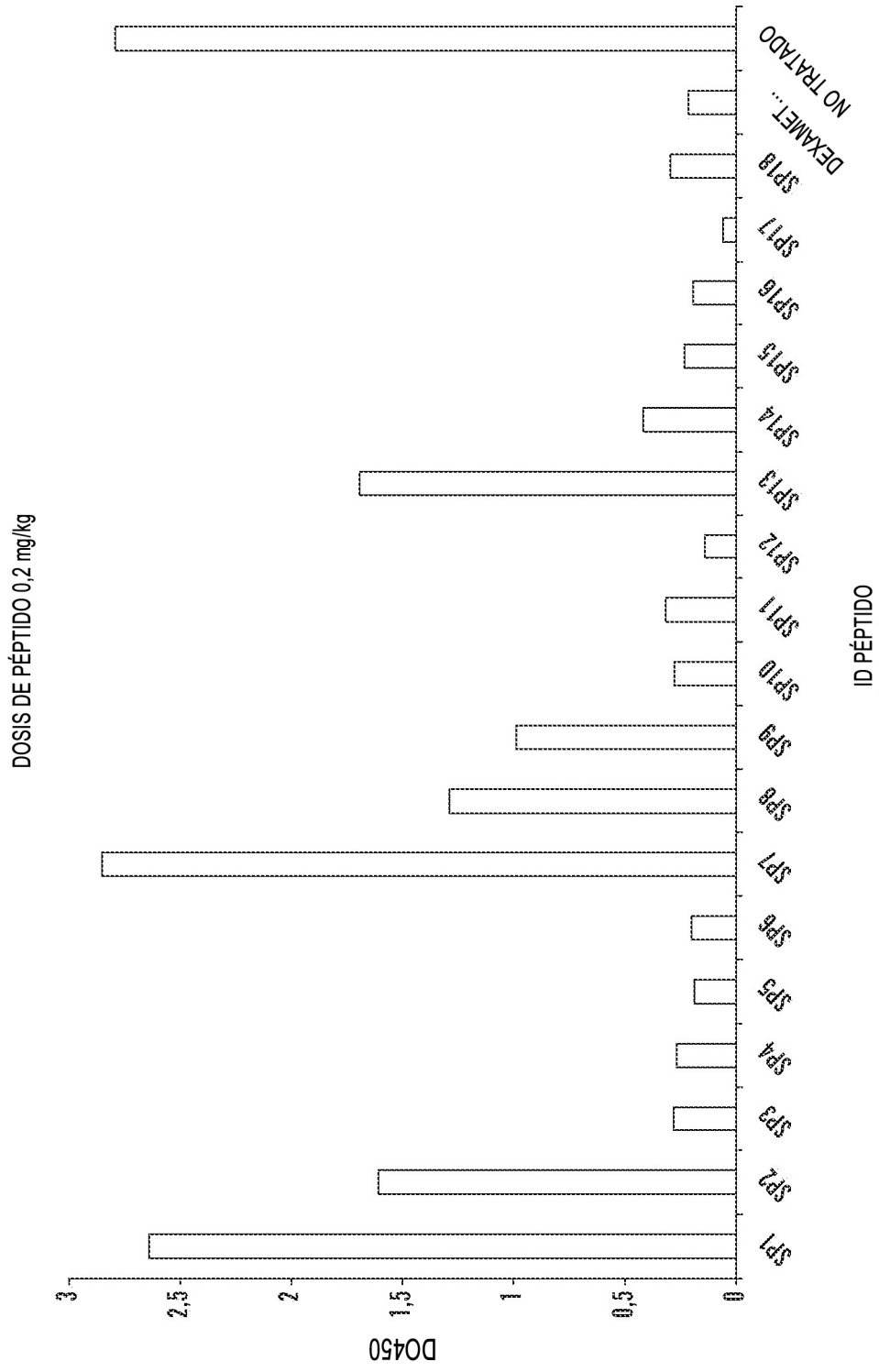


FIG. 4

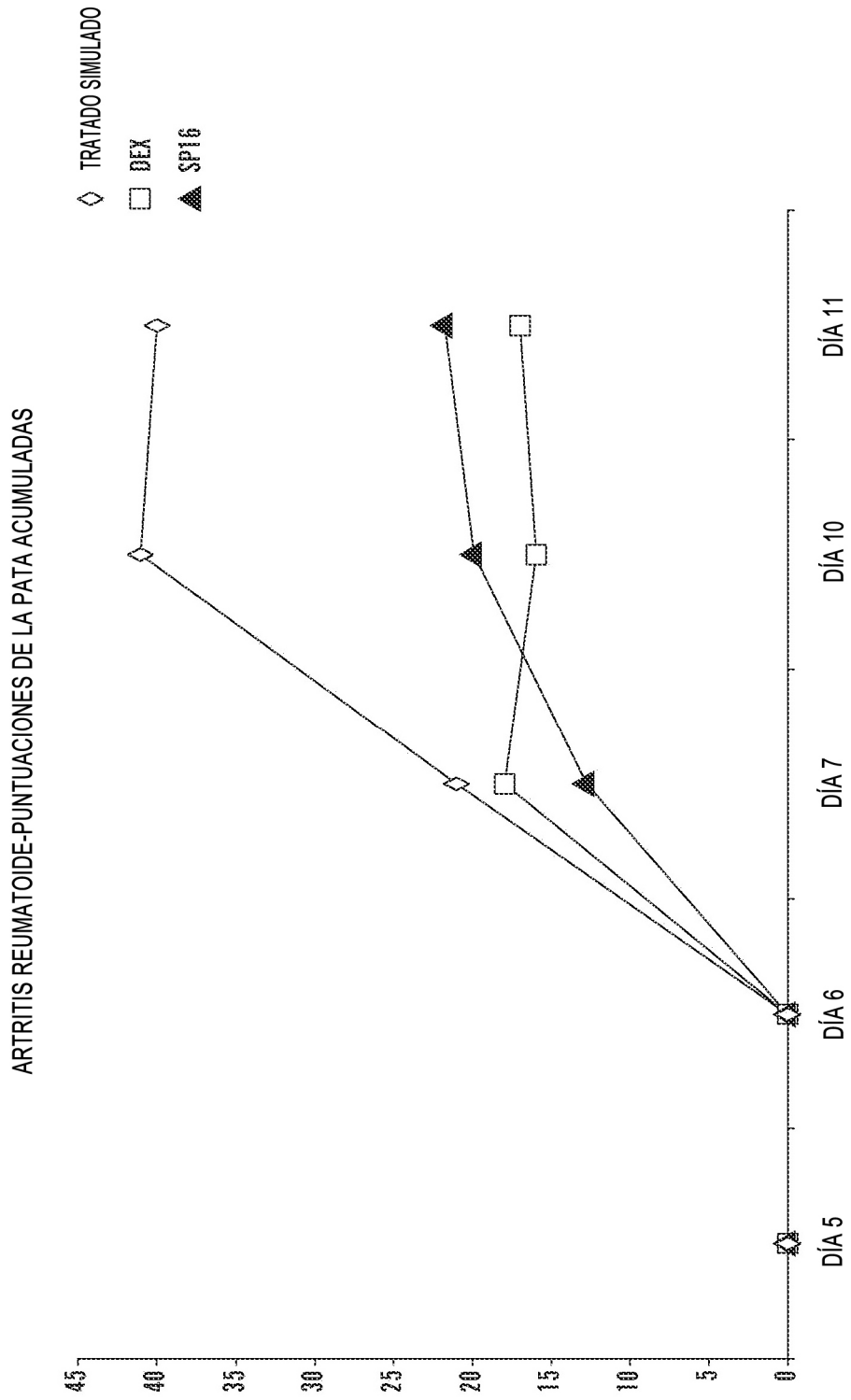


FIG. 5

ARTRITIS REUMATOIDE-PUNTUACIONES ACUMULADAS

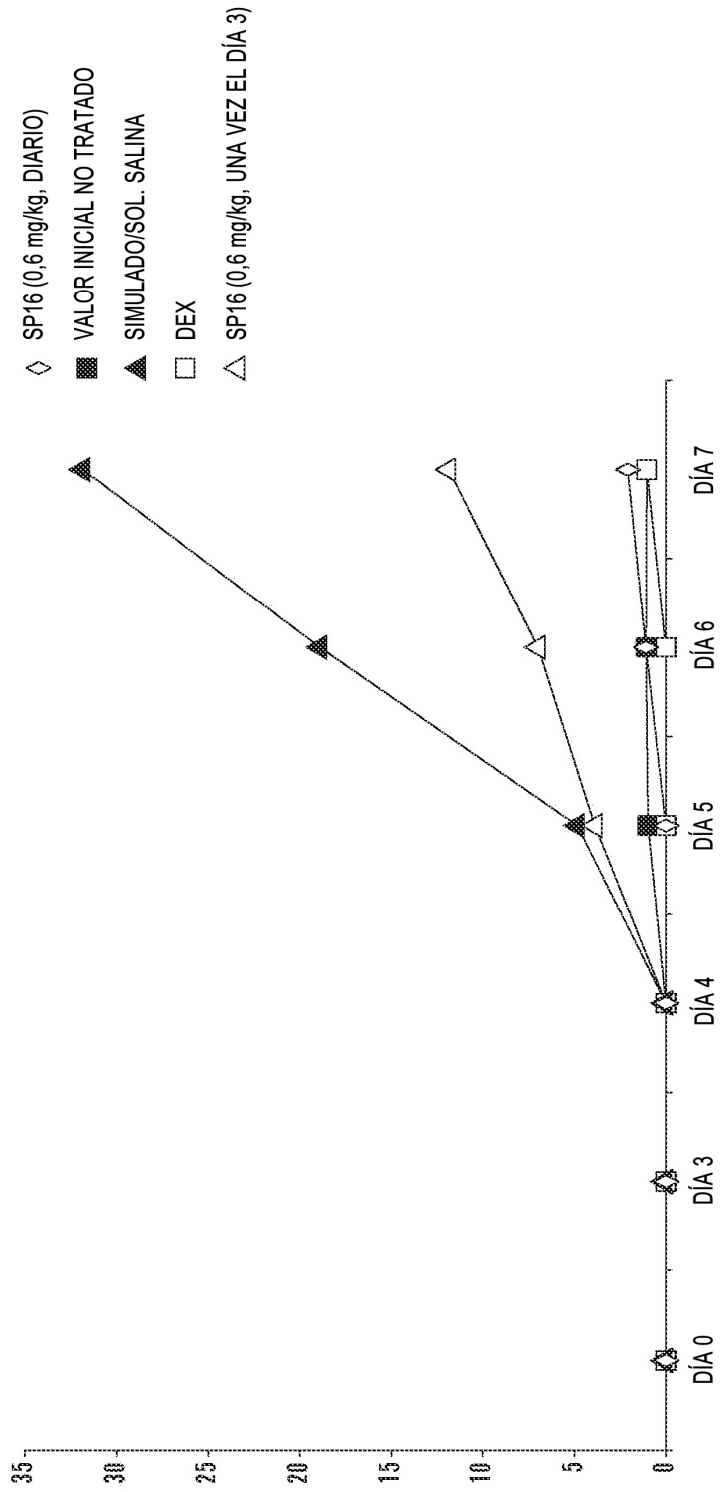


FIG. 6

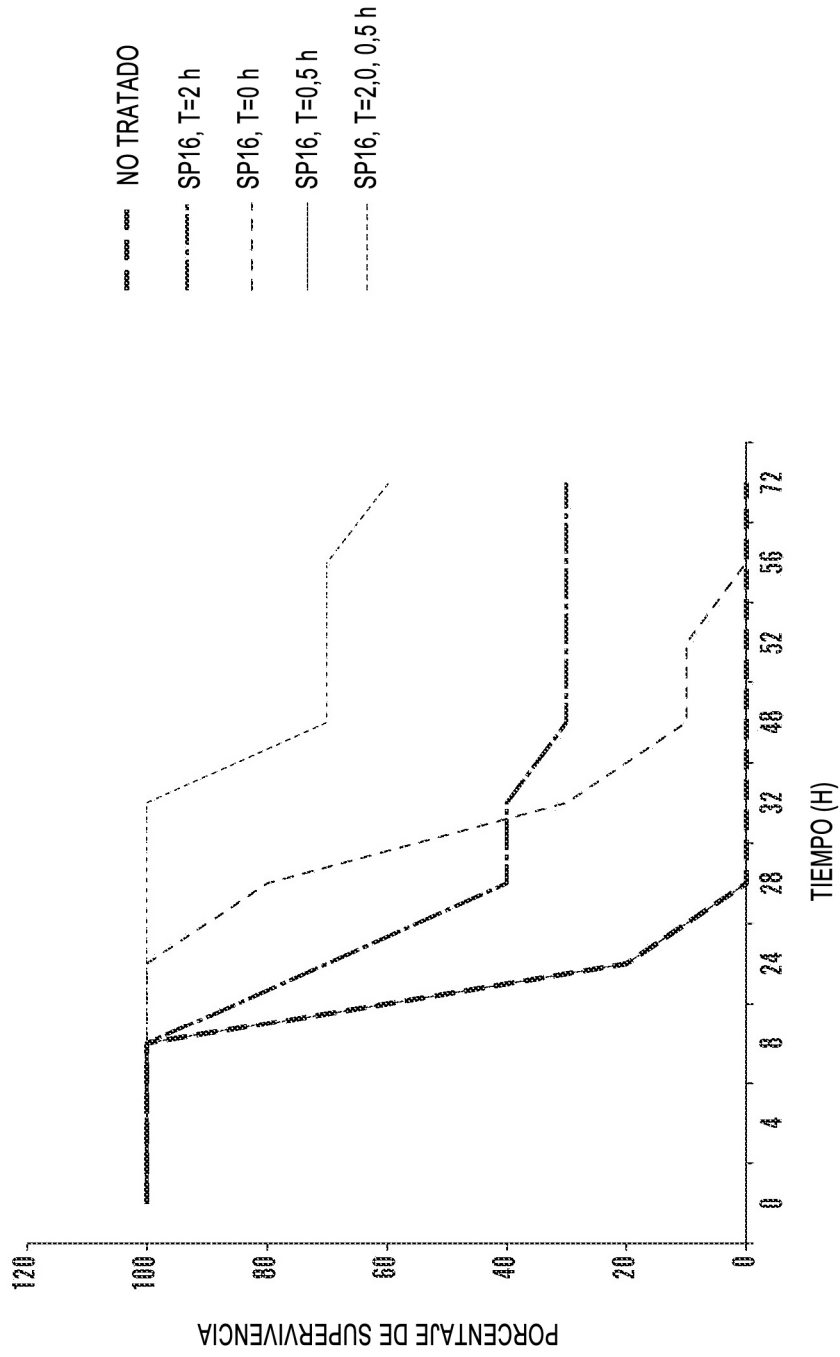


FIG. 7

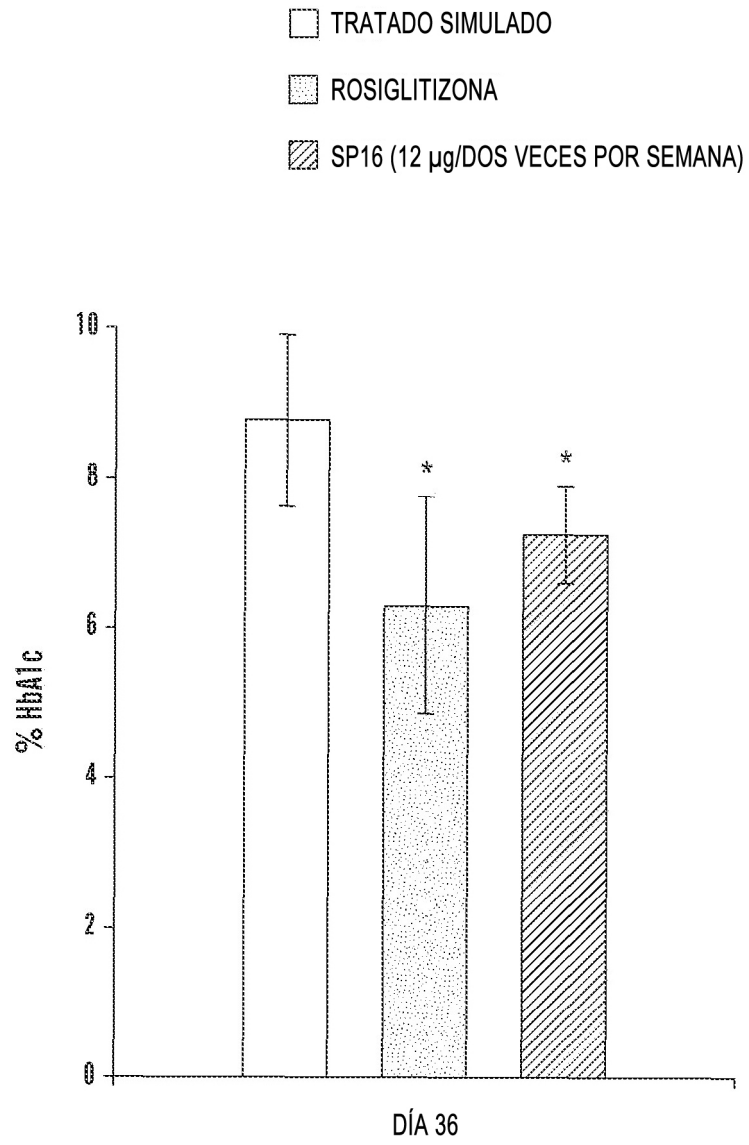


FIG. 8A

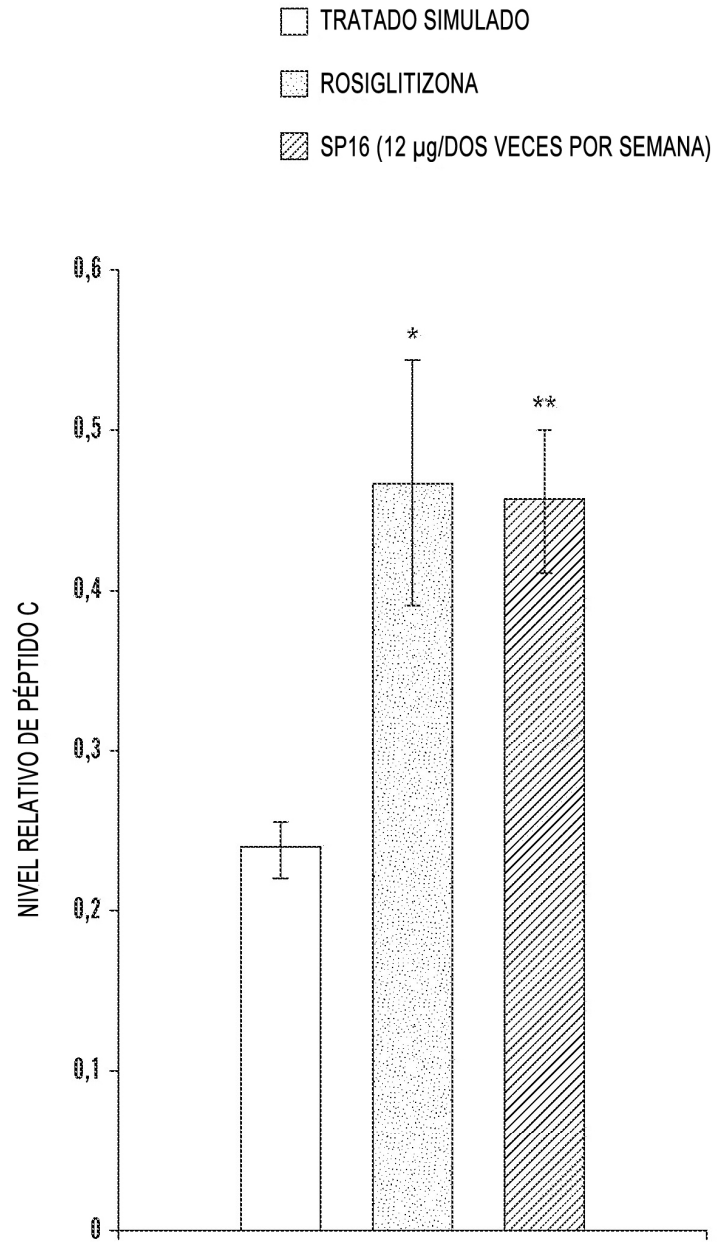


FIG. 8B

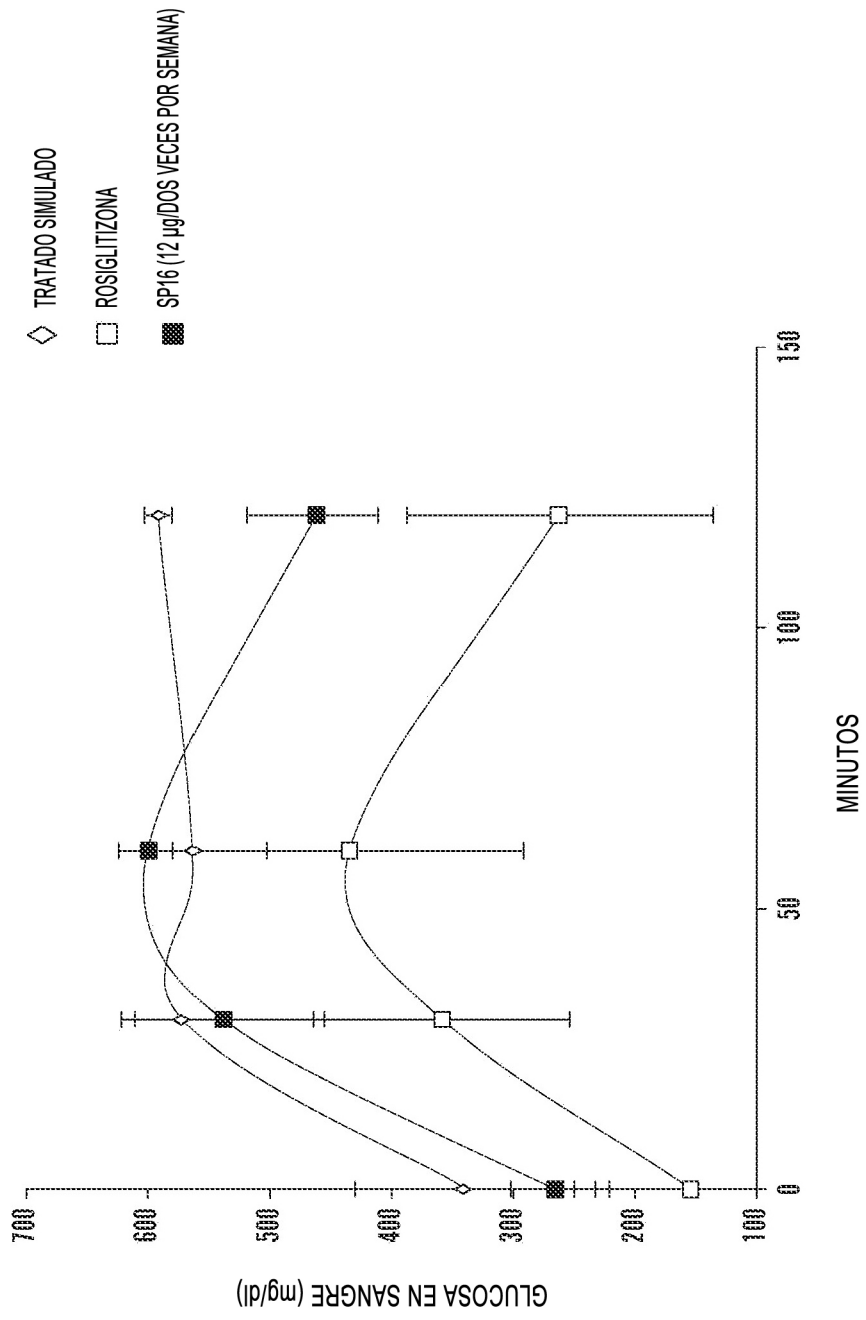


FIG. 8C

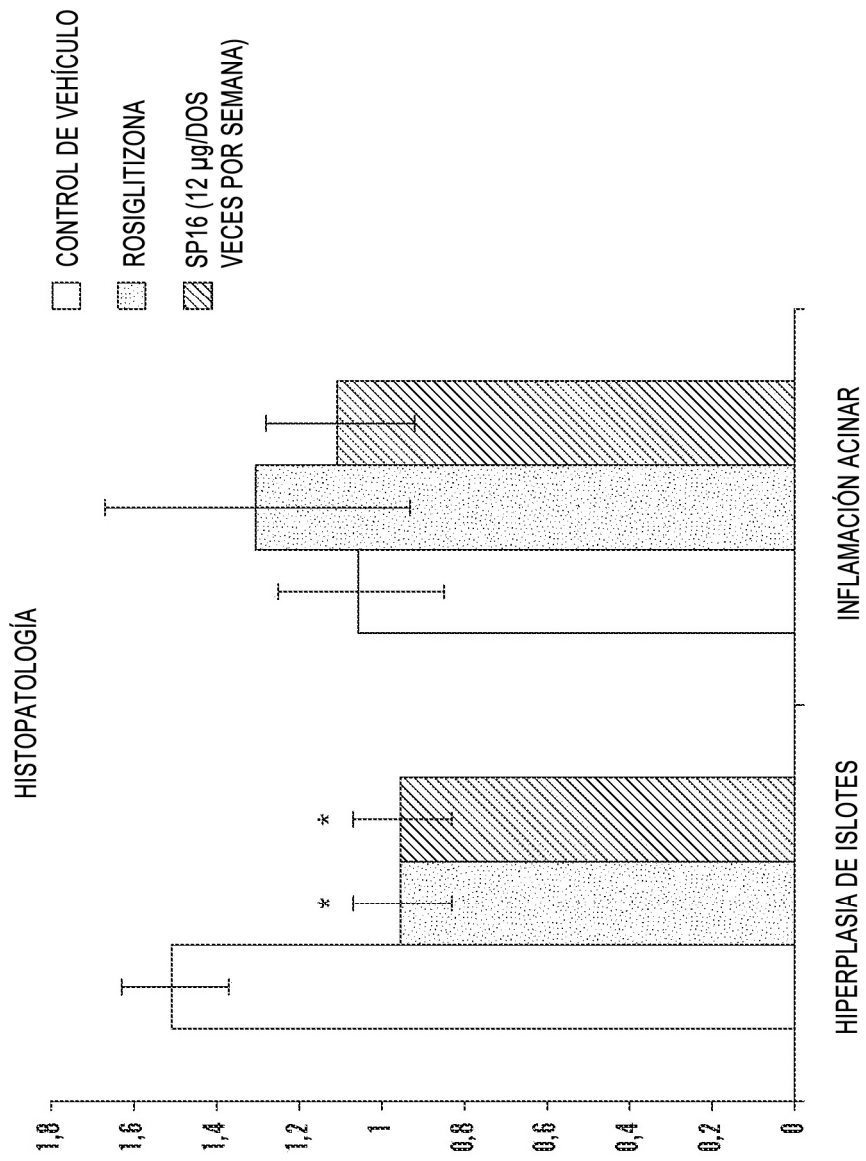


FIG. 8D

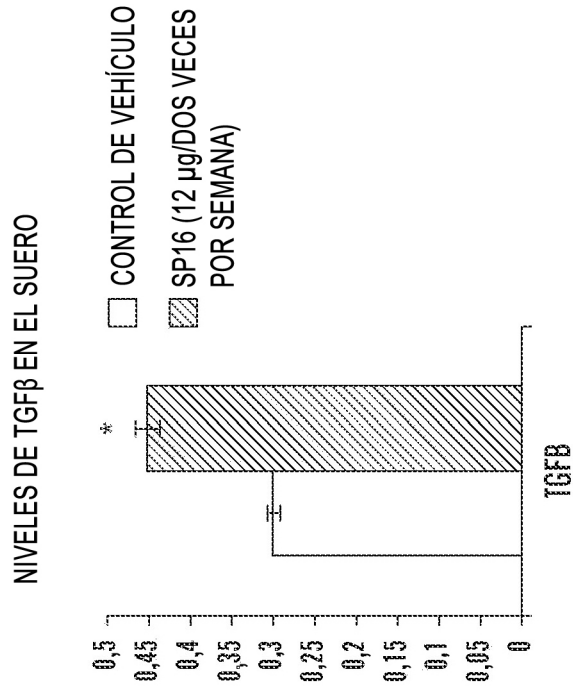


FIG. 8F

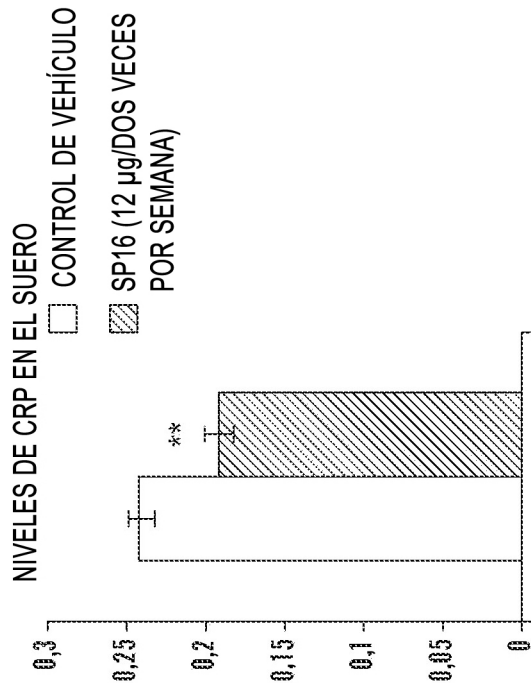


FIG. 8E

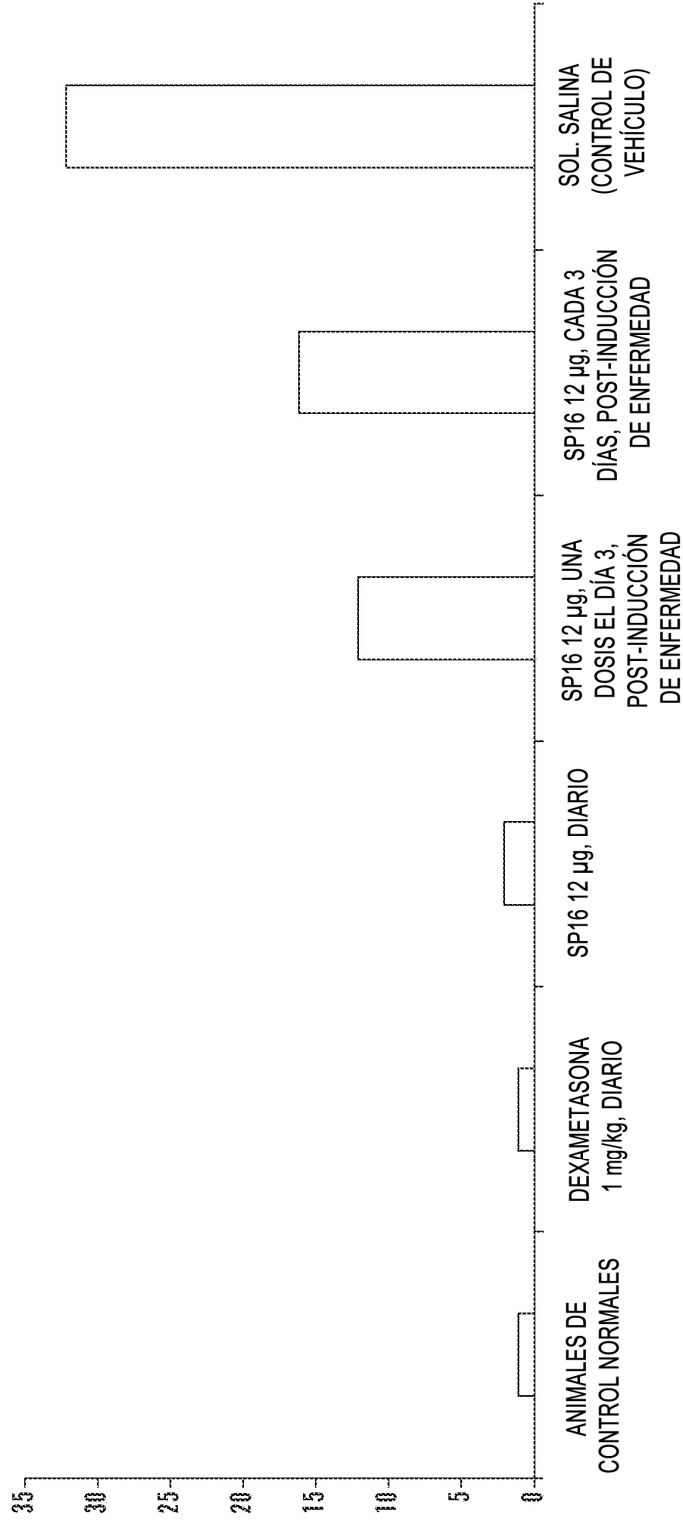


FIG. 9

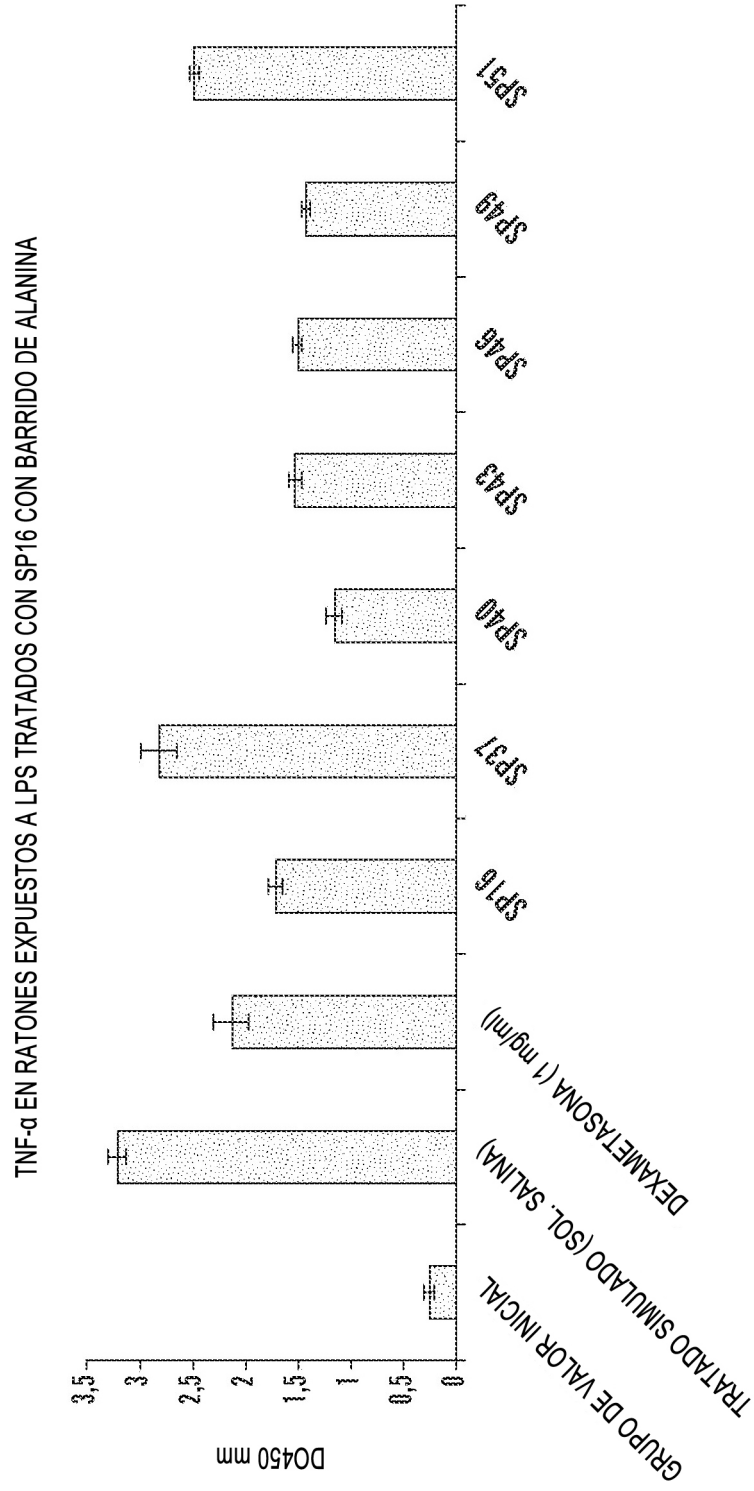


FIG. 10

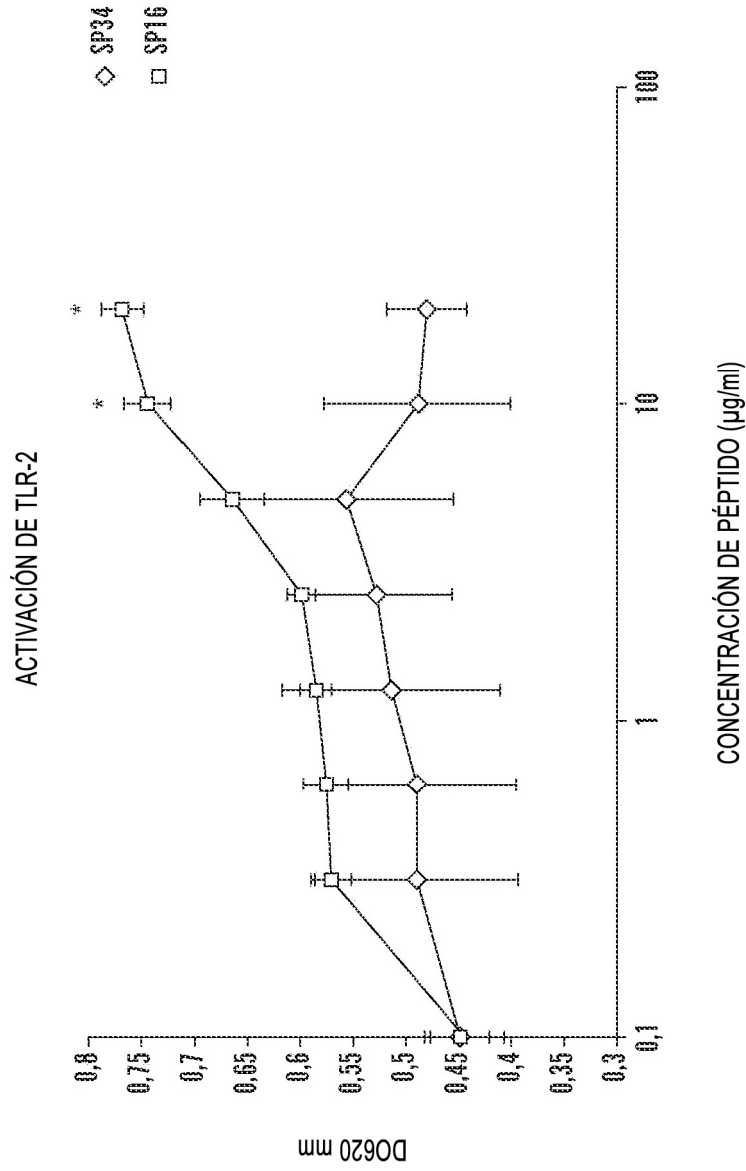


FIG. 11

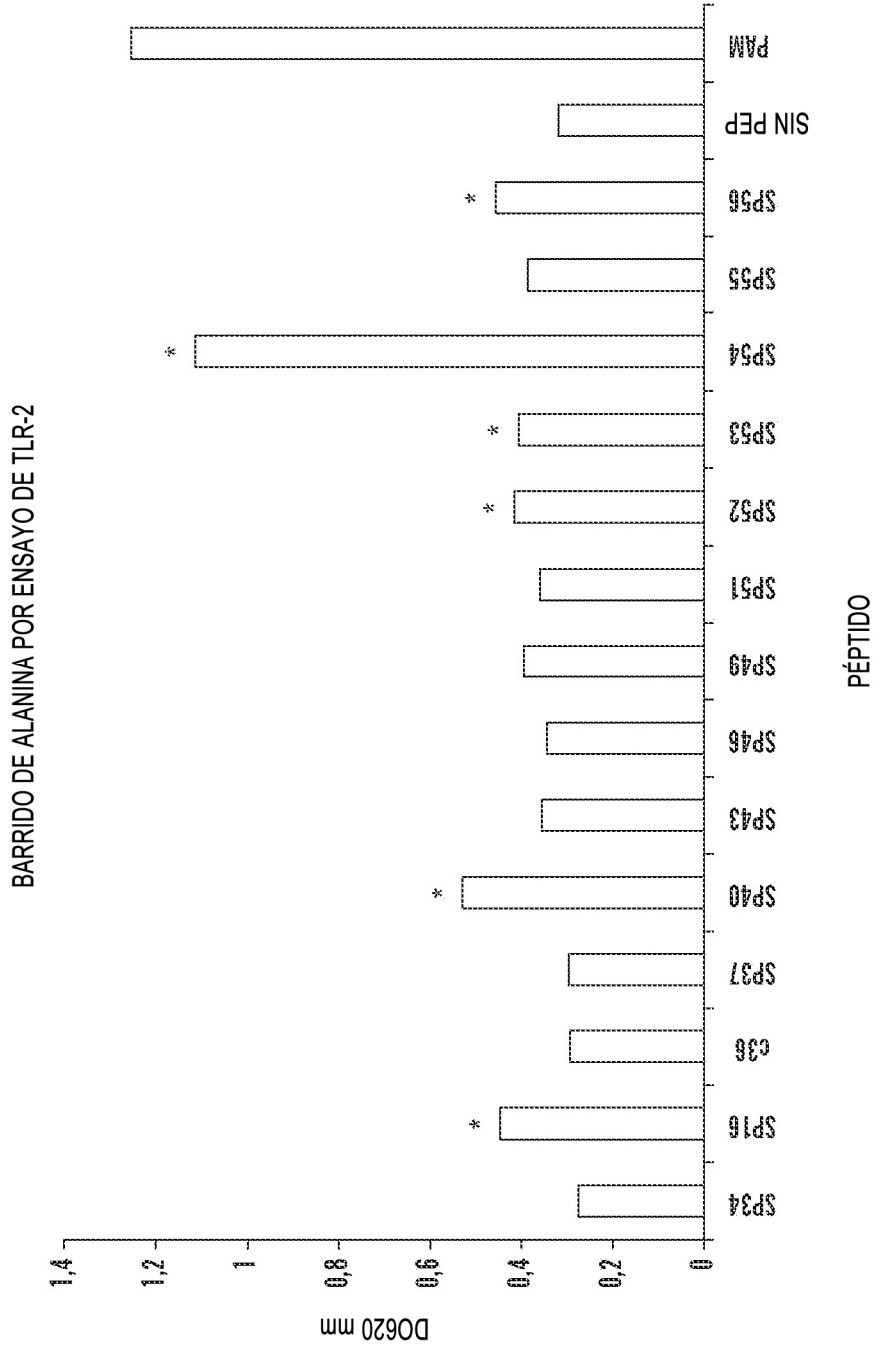


FIG. 12

Activación de TLR-2: ***

SP16	V K F N K P F V F L M I E Q N T K	***
C36	S I P P E V K F N K P F V F L M I E Q N T K S P L F M G K V V N P T Q K N E	NE
SP37	A A A N K P F V F L M I E Q N T K	NE
SP40	V K F A A A F V F L M I E Q N T K	***
SP43	V K F N K P A A A L M I E Q N T K	*
SP46	V K F N K P F V F A A A E Q N T K	*
SP49	V K F N K P F V F L M I A A A T K	**
SP51	V K F N K P F V F L M I E Q A A A	**
SP52	A K F N K P F V F L M I E Q N T K	***
SP53	V A F N K P F V F L M I E Q N T K	***
SP54	V K A N K P F V F L M I E Q N T K	*****
SP55	V K F N K P F V F L M I E Q N A K	**
SP56	V K F N K P F V F L M I E Q N T A	***
SP34	F P K M V P Q F N T E L K I F P E V N I K	NE

FIG. 13

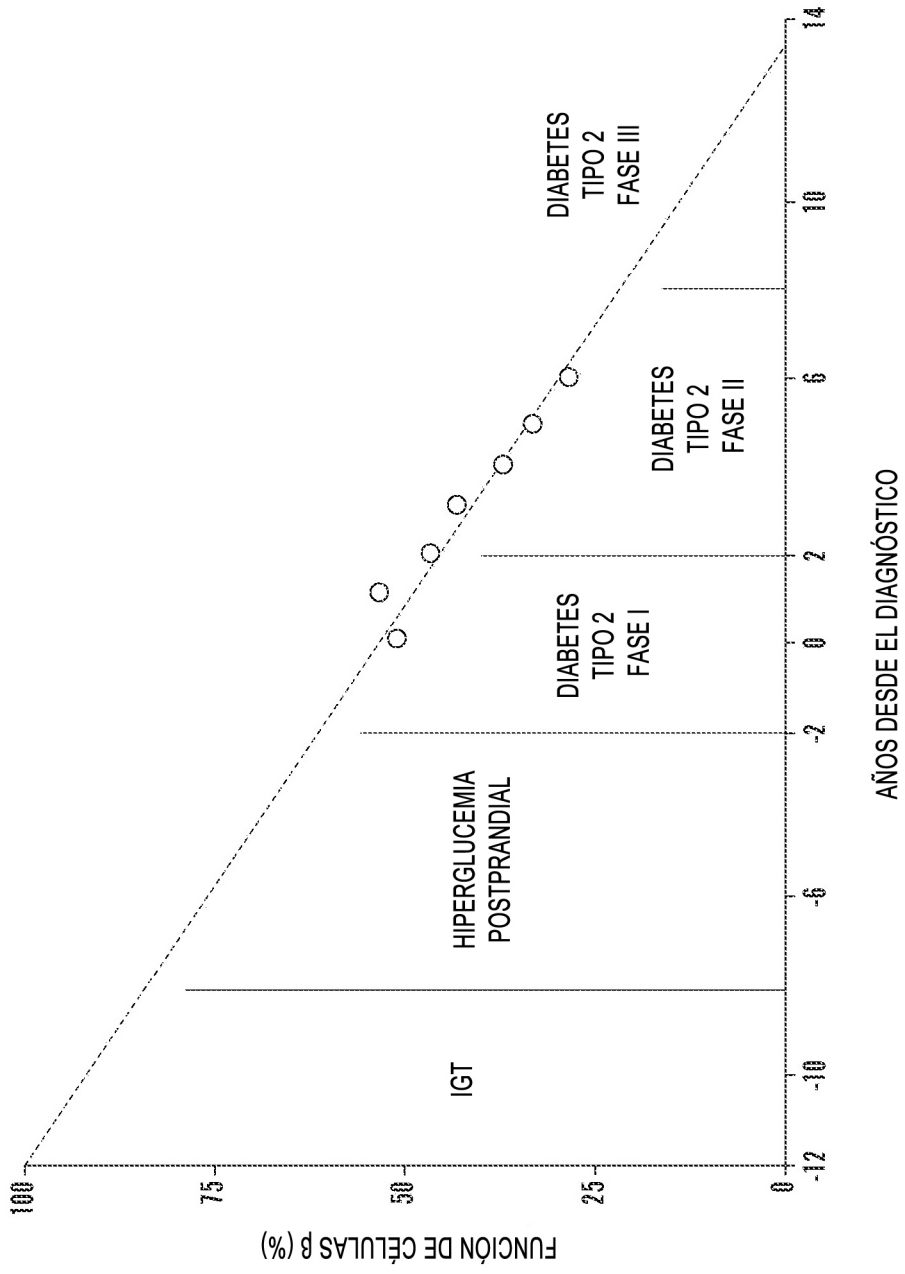


FIG. 14

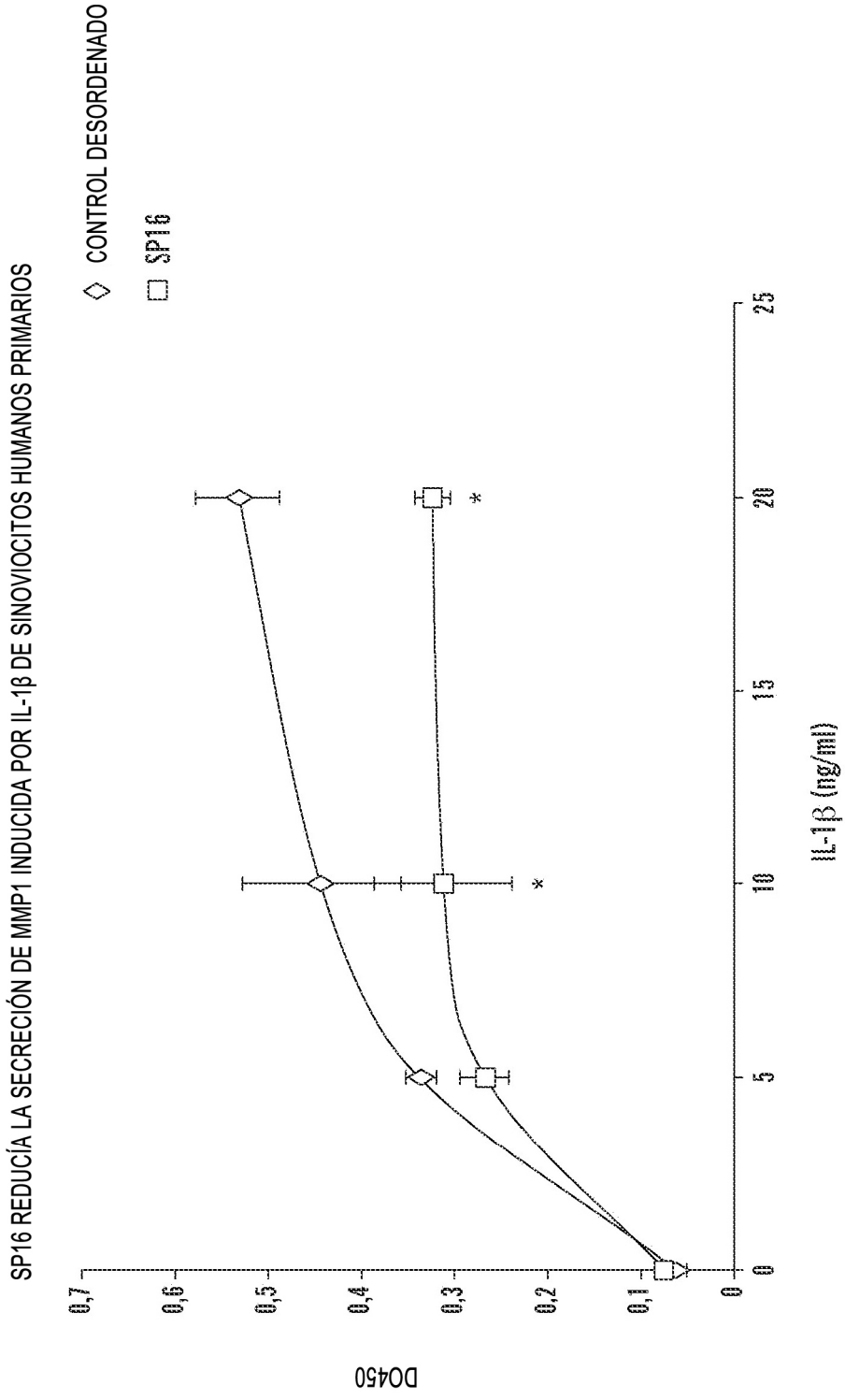


FIG. 15