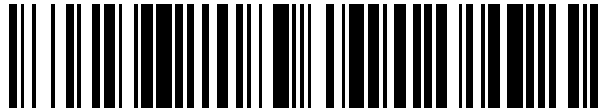


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 879 641**

51 Int. Cl.:

C07K 7/06	(2006.01)
A61K 8/64	(2006.01)
A61K 38/08	(2009.01)
A61P 29/00	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2016 PCT/KR2016/005529**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16190660**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2016 E 16800299 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.05.2021 EP 3305802**

54 Título: **Octapéptidos antiinflamatorias, antifibróticos y cicatrizantes de heridas y las composiciones que los contienen**

30 Prioridad:

26.05.2015 KR 20150073188

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.11.2021

73 Titular/es:

**GEMVAX & KAEL CO., LTD. (50.0%)
58, Techno 11-ro, Yuseong-gu
Daejeon 305-510, KR y
KIM, SANG JAE (50.0%)**

72 Inventor/es:

KIM, SANG JAE

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 879 641 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

Octapéptidos antiinflamatorias, antifibróticos y cicatrizantes de heridas y las composiciones que los contienen

5 **[Campo técnico]**

La presente invención se refiere a un péptido novedoso y una composición que lo incluye, y más particularmente, a una composición que incluye un péptido novedoso y es eficaz en procesos antiinflamatorios, antifibróticos y para cicatrización de heridas.

10 **[Estado de la técnica]**

Se sabe que el factor de necrosis tumoral (TNF), especialmente TNF- α , se libera de las células inflamatorias y, por lo tanto, provoca una variedad de respuestas citotóxicas, inmunes e inflamatorias. Se sabe que el TNF- α está implicado en el desarrollo o la prolongación de muchas enfermedades inflamatorias y enfermedades autoinmunes y, cuando se libera en la sangre para actuar sistémicamente, el TNF- α causa septicemia grave y choque septicémico. Como tal, dado que el TNF- α es un factor ampliamente involucrado en el sistema inmunológico de un organismo vivo, se han desarrollado activamente fármacos para inhibir el TNF- α . El TNF- α se biosintetiza en una forma inactiva y es escindido por una proteasa para convertirse en una forma activa, y una enzima involucrada en esta activación se conoce como enzima convertidora del factor de necrosis tumoral (TACE). Por lo tanto, las sustancias para inhibir la TACE pueden tratar, aliviar y prevenir enfermedades, afecciones, condiciones anormales, condiciones desfavorables, síntomas subjetivos deficientes y similares que son causados por TNF- α (documento KR2011-0060940A).

La fibrosis es una enfermedad que provoca la formación, acumulación y depósito anormales de matrices extracelulares por fibroblastos, y se refiere a la acumulación anormal de matrices de colágeno debido a una lesión o inflamación que cambia la estructura y función de varios tejidos. Independientemente de la ubicación de inicio de la fibrosis, la mayor parte de la etiología de la fibrosis incluye una acumulación excesiva de matrices de colágeno que reemplazan los tejidos normales. En particular, la fibrosis que se produce en los riñones, el hígado, los pulmones, el corazón, los huesos o la médula ósea y la piel induce la disfunción de los órganos y eventualmente conduce a la muerte en casos graves. Los fibroblastos sirven para formar un precursor de la matriz extracelular en condiciones normales para formar un tejido fibroso. La matriz extracelular, que es una sustancia intercelular de los tejidos conectivos, existe en forma de proteínas tales como fibronectina, laminina, condronectina y colágeno.

Mientras tanto, TGF- β desempeña un papel muy diverso en la formación anormal y acumulación de matrices extracelulares por fibroblastos, proliferación celular, respuestas inflamatorias y metástasis de células cancerosas, y se han identificado muchas vías y dianas de señalización celular. Por lo tanto, la investigación del TGF- β se ha realizado en muchos modelos de enfermedades, y la investigación y el desarrollo de fármacos de las enfermedades fibróticas y el cáncer se han realizado de forma más activa. Se ha informado que el TGF- β , que es un factor regulador de la proliferación celular, induce o restringe la proliferación celular y, por lo tanto, desempeña un papel vital en el desarrollo de diversas enfermedades, incluyendo cáncer, enfermedades cardíacas y diabetes, y se han informado diversas actividades fisiológicas de las mismas. Por ejemplo, existen acciones tales como la inhibición de la síntesis de TGF- β (la inhibición de la producción de factores reguladores de la proliferación celular), la acción antagonista de TGF- β (la alteración de los receptores de TGF y el impedimento de la transducción de señales), acción antagonista del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (la inhibición de factores inductores de la angiogénesis), acción inhibitoria de la MAP quinasa p38 (la inhibición de las enzimas de señalización de la proliferación celular), acción antiinflamatoria (la inhibición de la producción de TNF-alfa y MAPK) y similares. Por lo tanto, si se puede desarrollar una nueva composición farmacéutica capaz de inhibir más directamente el TGF- β o bloquear las vías de transducción de señales implicadas por el TGF- β , y que no tenga efectos secundarios, se pueden prevenir y tratar una variedad de enfermedades causadas por la fibrosis y el envejecimiento.

El proceso de cicatrización de heridas se divide en gran medida en inflamación, granulación, epitelización y fibroplasia. En la inflamación, se activan las células necesarias (fibroblastos, células epiteliales, etc.). Posteriormente, en la granulación, los fibroblastos depositan colágeno, por lo que la cantidad de colágenos aumenta y la herida madura. Además, se producen cambios en los queratinocitos en el sitio de la herida, y la epidermis del sitio de la herida se vuelve gruesa y avanza gradualmente a un estado en el que las células epiteliales se transfieren desde las células basales debajo de la epidermis a la epidermis, lo que se conoce como epitelización. A medida que la fibroplasia avanza a través de la epitelización, las fibras de colágeno forman una matriz de colágeno para llenar el sitio de la herida, y este proceso continúa durante un largo período de tiempo y finaliza, completando así la cicatrización de la herida. Por lo tanto, la proliferación de células epiteliales y la producción de colágeno también pueden considerarse como un mecanismo importante en la curación de heridas y la acción anti-envejecimiento.

[Divulgación]

[Problema técnico]

En estas circunstancias, los inventores de la presente invención desarrollaron péptidos novedosos y descubrieron que los péptidos novedosos eran eficaces en la inflamación, antifibrosis y cicatrización de heridas al reducir el TNF- α e inhibir el TGF- β , completando así la presente invención.

5 Un objetivo de la presente invención es proporcionar péptidos novedosos eficaces en procesos antiinflamatorios, antifibróticos y de cicatrización de heridas, y composiciones para prevenir o tratar una enfermedad que incluyen los péptidos novedosos.

[Solución técnica]

10 Una realización de la presente invención proporciona un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 o 12, siendo un péptido un fragmento de una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 o 12, un péptido que tiene 80% o más de homología de secuencia con una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 o 12 o un fragmento del mismo, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el péptido tiene actividad antiinflamatoria, antifibrótica y cicatrizante.

15 Una realización de la presente invención proporciona una composición antiinflamatoria que incluye el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

20 En una realización, la composición antiinflamatoria de acuerdo con la presente invención puede tener una actividad antiinflamatoria por inhibición del TNF- α .

25 En una realización, la composición antiinflamatoria de acuerdo con la presente invención previene o trata una o más enfermedades asociadas a la inflamación seleccionadas del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), septicemia, choque por endotoxinas, hepatitis y diabetes tipo 1.

30 Una realización de la presente invención proporciona una composición para prevenir, tratar o aliviar la fibrosis de un órgano corporal, incluyendo la composición el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

35 En una realización, la composición para prevenir, tratar o aliviar la fibrosis de un órgano corporal, de acuerdo con la presente invención, tiene la actividad de inhibir la fibrosis de un órgano corporal mediante la inhibición de la señalización del TGF- β .

40 En una realización, la composición para prevenir, tratar o aliviar la fibrosis de un órgano corporal, de acuerdo con la presente invención, previene o trata la fibrosis inducida por uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer, administración de un fármaco contra el cáncer y exposición a la radiación.

45 En una realización, la composición para prevenir, tratar o aliviar la fibrosis de un órgano corporal, de acuerdo con la presente invención, previene o trata la fibrosis de tejidos celulares de cáncer seleccionados del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, melanoma y cáncer de ovario.

50 Una realización de la presente invención también proporciona una composición para tratar o aliviar una herida, incluyendo la composición el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

55 En una realización, la composición para tratar o aliviar una herida, de acuerdo con la presente invención, tiene un efecto de cicatrización de heridas al inducir la síntesis de colágeno.

60 En una realización, la composición para tratar o aliviar una herida, de acuerdo con la presente invención, previene o trata una enfermedad cutánea seleccionada del grupo que consiste en arrugas de la piel, sequedad de la piel, depresiones de la piel, quemaduras epidérmicas, laceraciones epidérmicas, heridas epidérmicas y combinaciones de las mismas; o agravamiento de las mismos.

65 Una realización de la presente invención también proporciona una composición cosmética que comprende el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Una realización de la presente invención también proporciona el uso de una composición que comprende el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo como composición cosmética.

Una realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos seleccionados entre los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 como ingrediente activo.

Una realización de la presente invención también proporciona un kit utilizado para uno o más efectos seleccionados entre antiinflamación, antifibrosis, cicatrización de heridas y mejora del estado de la piel, incluyendo el kit: una composición que incluye el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo; y una instrucción que instruya uno o más seleccionados de una dosis, vía de administración, número de dosis e indicaciones de la composición.

La presente divulgación también proporciona un procedimiento para aliviar, prevenir o tratar la inflamación, la fibrosis o la herida; o mejorar el estado de la piel, incluyendo el procedimiento administrar una composición que incluye el péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo a un sujeto que necesita uno o más efectos seleccionados de antiinflamación, antifibrosis, tratamiento, cicatrización de heridas y mejora del estado de la piel.

La presente divulgación también proporciona un nuevo uso del péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En una realización, el uso puede ser el alivio, la prevención o el tratamiento de la inflamación, la fibrosis o una herida. En otra realización, el uso puede ser la mejora del estado de la piel. En una realización, el estado de la piel puede ser una o más arrugas de la piel de acuerdo con el envejecimiento de la piel, la sequedad de la piel, la elasticidad reducida de la piel y las depresiones de la piel. Por ejemplo, el uso puede ser un uso como composición cosmética.

Una realización de la presente invención permite al péptido o una sal del mismo aliviar, prevenir o tratar la inflamación, la fibrosis o una herida.

[Efectos ventajosos]

Los péptidos que tienen secuencias de SEQ ID NOS de acuerdo con la presente invención son efectivos en el tratamiento antiinflamatorio, antifibrosis y cicatrización de heridas, y por lo tanto se espera proporcionar su uso para un procedimiento de prevención o tratamiento de enfermedades asociadas con inflamación, fibrosis y heridas.

[Descripción de dibujos]

La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados de la medición por RT-qPCR de las cantidades de expresión de ARNm de TNF- α de una línea celular THP-1 tratada con LPS tratada con cada uno de los péptidos novedosos de Pep-WH-1 a Pep-WH-12 a cada concentración (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M), en la que los resultados de la medición se representan como relaciones de inhibición.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados de la medición por ELISA de las cantidades de TNF- α de grupos experimentales obtenidos al administrar cada uno de los péptidos novedosos de Pep-WH-1 a Pep-WH-12 a una línea celular THP-1 en la que se indujo inflamación por LPS, a cada concentración (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M), un control sin tratamiento y un control positivo tratado con estradiol (E2).

La Figura 3 ilustra una imagen (lado superior) y un gráfico (lado inferior) que muestran los resultados de la medición de la expresión de fosfo-Smad 2/3 como un marcador de fibrosis, Smad 2/3, y un gen de referencia GAPDH, obtenido por transferencia Western y usando un analizador de imágenes, de un control en el que no se trató una línea celular HepG2, un control de fibrosis tratado solo con TGF- β , un control positivo tratado con cada uno de TGF- β y SB43152, y grupos experimentales tratados con los péptidos novedosos de Pep-WH-1 a Pep-WH-4 a cada concentración (1 μ M y 10 μ M).

La Figura 4 ilustra una imagen (lado superior) y un gráfico (lado inferior) que muestran los resultados de la medición de la expresión de fosfo-Smad 2/3 como marcador de fibrosis, Smad 2/3, y un gen de referencia GAPDH, obtenido por transferencia Western y usando un analizador de imágenes, de un control en el que no se trató una línea celular HepG2, un control de fibrosis tratado solo con TGF- β , un control positivo tratado con cada uno de TGF- β y SB43152, y grupos experimentales tratados con péptidos novedosos de Pep-WH-5 a Pep-WH-8 a cada concentración (1 μ M y 10 μ M).

La Figura 5 ilustra una imagen (lado superior) y un gráfico (lado inferior) que muestran los resultados de la medición de la expresión de fosfo-Smad 2/3 como marcador de fibrosis, Smad 2/3, y un gen de referencia GAPDH, obtenido por transferencia Western y usando un analizador de imágenes, de un control en el que no se trató una línea celular HepG2, un control de fibrosis tratado solo con TGF- β , un control positivo tratado con cada uno de TGF- β y SB43152, y grupos experimentales tratados con péptidos novedosos de Pep-WH-9 a Pep-WH-12 a cada concentración (1 μ M y 10 μ M).

La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados de medición de las áreas de la herida de un control no tratado y un modelo animal al que se le indujo una herida obtenido al inducir una herida en ratas SD, obtenido inmediatamente después de la herida (día 0) y el día 1, día 3, día 5, día 7, día 10 y día 11, en los que el modelo animal al que se le indujo una herida se trató con 50 μ l del péptido novedoso Pep-WH-8 a una concentración de 100 μ g/ml inmediatamente después de la herida y cada dos días.

La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de las áreas de la herida de un control no tratado y un modelo animal al que se le indujo una herida obtenido al inducir una herida en ratas SD, obtenido inmediatamente después de la herida (día 0) y el día 1, día 3, día 5, día 7, día 10 y día 11, en los que el modelo animal al que se le indujo una herida se trató con 50 μ l del péptido novedoso Pep-WH-9 a una concentración de 100 μ g/ml inmediatamente después de la herida y cada dos días.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de medición de las áreas de la herida de un control no tratado y un modelo animal al que se le indujo una herida obtenido al inducir una herida en ratas SD, obtenido inmediatamente después de la herida (día 0) y el día 1, día 3, día 5, día 7, día 10 y día 11, en los que el modelo

animal al que se le indujo una herida se trató con 50 µl de Pep-WH-11 a una concentración de 100 µg/ml inmediatamente después de la herida y cada dos días.

La Figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de las áreas de la herida de un control no tratado y un modelo animal al que se le indujo una herida obtenido al inducir una herida en ratas SD, obtenido inmediatamente después de la herida (día 0) y el día 1, día 3, día 5, día 7, día 10 y día 11, en los que el modelo animal al que se le indujo una herida se trató con 50 µl del péptido novedoso Pep-WH-12 a una concentración de 100 µg/ml inmediatamente después de la herida y cada dos días.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de la medición de la intensidad de fluorescencia promedio del grado de producción de colágeno de los tejidos de biopsia teñidos con tinción tricrómica de Masson de dos ratas el día 3 y el día 5 tomados de cada uno de los grupos experimentales y del control no tratado obtenidos mediante el tratamiento de ratas SD a las que se les indujo una herida como un modelo animal al que se le indujo una herida con 50 µL de cada uno de los péptidos novedosos Pep-WH-8, Pep-WH-9 y Pep-WH-12 y 50 µL del péptido Pep-WH-11 a una concentración de 100 µg/ml, inmediatamente después de la herida y cada dos días.

15 [Mejor modo de llevar a cabo la invención]

Aunque la presente invención permite varios cambios y numerosas realizaciones, ahora se describirán con más detalle realizaciones particulares de la presente invención. Sin embargo, no se pretende limitar la presente invención a modos particulares de práctica, y debe interpretarse que incluye todos los cambios, equivalentes y sustitutos dentro del alcance de la presente invención. En la descripción de la presente invención, se omiten ciertas explicaciones detalladas de la técnica relacionada cuando se considera que pueden oscurecer innecesariamente la esencia de la invención.

De acuerdo con una realización de la presente invención, se proporciona un péptido novedoso que tiene una secuencia de una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12.

Un péptido divulgado en la presente memoria descriptiva puede incluir péptidos que tienen 80% o más de homología de secuencia, 85% o más de homología de secuencia, 90% o más de homología de secuencia, 95% o más de homología de secuencia, 96% o más de homología de secuencia, 97% o más de homología de secuencia, 98% o más de homología de secuencia y 99% o más de homología de secuencia con el péptido novedoso que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12. Además, el péptido divulgado en la presente la memoria descriptiva puede incluir el péptido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12, y un péptido en el que se modifican uno o más aminoácidos, dos o más aminoácidos, tres o más aminoácidos, cuatro o más aminoácidos, cinco o más aminoácidos, seis o más aminoácidos, o siete o más aminoácidos.

En una realización de la presente invención, una modificación de aminoácidos se refiere a un cambio en las propiedades físicas y químicas de los péptidos. Por ejemplo, se pueden realizar modificaciones de aminoácidos para mejorar la estabilidad térmica de los péptidos, cambiar la especificidad del sustrato, cambiar el pH óptimo.

El término "aminoácido" como se usa en este documento incluye 22 aminoácidos estándar incorporados naturalmente en péptidos, además de isómeros D y aminoácidos modificados de los mismos. Por consiguiente, el péptido de acuerdo con una realización de la presente invención puede ser un péptido que incluye D-aminoácidos. Mientras tanto, un péptido de acuerdo con otra realización de la presente invención puede incluir aminoácidos no estándar producidos mediante modificaciones postraduccionales. Los ejemplos de la modificación postraduccional incluyen fosforilación, glicosilación, acilación (que incluye, por ejemplo, acetilación, miristoilación y palmitoilación), alquilación, carboxilación, hidroxilación, glicación, biotilación, ubiquitinación, modificación de propiedades químicas (por ejemplo, desimidación y desamidación por eliminación beta) y modificación estructural (por ejemplo, formación de puentes disulfuro). Además, la modificación postraduccional incluye la modificación de aminoácidos resultantes de reacciones químicas que ocurren en la unión con entrecruzadores para formar un péptido conjugado, por ejemplo, modificación de aminoácidos, tal como un cambio en el grupo amino, grupo carboxilo o cadenas laterales.

El péptido divulgado en la presente memoria descriptiva puede ser un péptido de tipo silvestre identificado y aislado de fuentes naturales. Mientras tanto, el péptido divulgado en la presente memoria descriptiva puede ser una variante artificial que tiene una secuencia de aminoácidos en la que uno o más aminoácidos están sustituidos, eliminados y/o insertados, en comparación con péptidos, que son fragmentos de la SEQ ID NO: 1. Las modificaciones de los aminoácidos en los polipéptidos de tipo silvestre, así como la variante artificial, incluyen la sustitución conservadora de aminoácidos que no afecta significativamente al plegamiento y/o la actividad de una proteína. Los ejemplos de la sustitución conservadora de aminoácidos incluyen la sustitución de aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina), aminoácidos ácidos (ácido glutámico y ácido aspártico), aminoácidos polares (glutamina y asparagina), aminoácidos hidrófobos (leucina, isoleucina, valina y metionina), aminoácidos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) y aminoácidos pequeños (glicina, alanina, serina y treonina). Generalmente, las sustituciones de aminoácidos que no cambian la actividad específica se conocen en la técnica. Las sustituciones más frecuentes son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Tyr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, y sus sustituciones en la dirección opuesta. En la siguiente tabla se muestran otros ejemplos de sustituciones conservadoras.

<Tabla 1>

Aminoácido original	Ejemplo de sustitución de residuos	Sustitución preferible del residuo
Ala (A)	val; leu; ile	Val
Arg (R)	lys; gln; asn	Lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	Gln
Asp (D)	glu; asn	Glu
Cys (C)	ser; ala	Ser
Gln (Q)	asn; glu	Asn
Glu (E)	asp; gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	Arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucina	Leu
Leu (L)	norleucina; ile; val; met; ala; phe	Ile
Lys (K)	arg; gln; asn	Arg
Met (M)	leu; phe; ile	Leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	tyr; phe	Tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	Phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucina	Leu

La modificación sustancial de las propiedades biológicas de los péptidos se puede realizar seleccionando sitios de sustitución en los que: (a) los efectos de la modificación sustancial para el mantenimiento de la estructura de una cadena principal polipeptídica en una región de sustitución, por ejemplo, una lámina o estructura tridimensional helicoidal, (b) los efectos de la misma para mantener las cargas o la hidrofobicidad de la molécula en un sitio diana, o (c) los efectos de la misma para mantener la mayor parte de las cadenas laterales son significativamente diferentes. Los residuos naturales se dividen en los siguientes grupos de acuerdo con las propiedades generales de la cadena lateral:

- (1) Hidrofobicidad: Norleucina, met, ala, val, leu, ile;
- (2) Hidrofilicidad neutra: cys, ser, thr;
- (3) Acidez: asp, glu;
- (4) Basicidad: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) Residuos que afectan la orientación de la cadena: gly, pro; y
- (6) Aromaticidad: trp, tyr, phe.

Se pueden realizar sustituciones no conservadoras intercambiando un miembro de cualquiera de estas clases por otra clase. Cualquier residuo de cisteína que no tenga relación con el mantenimiento de la estructura estereoscópica adecuada de los péptidos se sustituye generalmente por serina y, por lo tanto, puede mejorar la estabilidad oxidativa de las moléculas y prevenir un entrecruzamiento inadecuado. Por el contrario, se pueden añadir un enlace o enlaces de cisteína al péptido para mejorar la estabilidad del mismo.

Otros tipos de variantes de aminoácidos de péptidos son aquellos en los que se modifican los patrones de glicosilación de anticuerpos. El término "cambio", como se usa en este documento, se refiere a la eliminación de uno o más residuos de carbohidratos que se encuentran en los péptidos y/o la adición de uno o más sitios de glicosilación no presentes en los péptidos.

La glicosilación de péptidos está típicamente conectada a N o conectada a O. El término "conectada a N" como se usa en este documento indica que un residuo de carbohidrato está unido a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Como secuencias de tripéptidos, asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido excepto prolina, son secuencias de reconocimiento para unir enzimáticamente un residuo de carbohidrato a la cadena lateral de asparagina. Por lo tanto, como una de estas secuencias de tripéptidos está presente en un polipéptido, se genera un sitio de glicosilación potencial. Glicosilación conectada a O significa unir cualquiera de los azúcares N-acetilgalactosamina, galactosa y xilosa al aminoácido hidroxilado, más comúnmente, serina o treonina, pero se puede usar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina.

La adición de un sitio de glicosilación a un péptido se realiza convenientemente cambiando una secuencia de aminoácidos para que contenga la secuencia de uno o más tripéptidos antes mencionada (en el caso del sitio de glicosilación conectado a N). Estos cambios se pueden realizar mediante la adición de uno o más residuos de serina

o treonina a la secuencia de un anticuerpo inicial o mediante la sustitución del mismo con estos residuos (en el caso del sitio de glicosilación conectado a O).

5 Además, el péptido que tiene una secuencia de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 de acuerdo con una realización de la presente invención tiene una baja toxicidad intracelular y es muy estable *in vivo*. Cada uno de los péptidos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 de acuerdo con la presente invención es un péptido que tiene una longitud de 8 aminoácidos de la siguiente manera.

10 Los péptidos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 se muestran en la Tabla 2 a continuación. El término "nombre" que se muestra en la Tabla 2 se usa para distinguir los péptidos entre sí.

15 El péptido denominado "Pep-WH-11" como se menciona en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que no se divulga en la presente solicitud y que es diferente de los péptidos reivindicados de las SEQ ID NOS: 1-10 y 12.

<Tabla 2>

SEQ ID NO.	Nombre	Secuencia	Peso molecular
1	Pep-WH-2	ALSSRLRA	872,52
2	Pep-WH-2	ALSSRLRG	858,50
3	Pep-WH-3	ALSSRLRF	948,55
4	Pep-WH-4	ALSTRLRA	886,53
5	Pep-WH-5	ALSTRLRG	872,52
6	Pep-WH-6	ALSTRLRF	962,57
7	Pep-WH-7	ALTSRVRA	872,52
8	Pep-WH-8	ALTSRVRG	858,50
9	Pep-WH-9	ALTSRVRF	948,55
10	Pep-WH-10	ALTSKLRA	858,53
12	Pep-WH-12	ALTSKLRF	934,56

20 Una realización de la presente invención también proporciona una composición farmacéutica que incluye uno o más seleccionadas de los péptidos que tienen las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 como ingrediente activo.

25 En una composición farmacéutica para prevenir o tratar enfermedades asociadas con inflamación, fibrosis y heridas de acuerdo con una realización de la presente invención, el contenido del péptido de cualquiera de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 puede oscilar entre 0,01 mg/ml a 0,1 mg/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml y 100 mg/ml. Sin embargo, cuando se muestra una diferencia en los efectos de acuerdo con la dosis, el contenido de los mismos puede ajustarse apropiadamente. Cuando el contenido de cada péptido está dentro del intervalo anterior, no solo es suficiente para exhibir los efectos deseados de la presente invención, sino que también se pueden satisfacer tanto la estabilidad como la seguridad de la composición, y puede ser apropiado en términos de efectos en relación con los costes.

30 La composición de acuerdo con una realización de la presente invención se puede aplicar a todos los animales, incluidos humanos, perros, pollos, cerdos, vacas, ovejas, cobayas o monos.

35 La composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente invención puede administrarse por vía oral, intrarrectal, percutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intramedular, intradural, subcutánea o similares.

40 Una preparación para administración oral puede ser un comprimido, una píldora, una cápsula blanda o dura, un gránulo, un polvo, una preparación líquida o una emulsión, pero la presente invención no se limita a las mismas. Una formulación para administración parenteral puede ser una inyección, un agente de goteo, una loción, un ungüento, un gel, una crema, una suspensión, una emulsión, un supositorio, un parche o un agente de atomización, pero la presente invención no está limitada a los mismos.

45 La composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir un aditivo tal como un diluyente, un excipiente, un lubricante, un aglutinante, un desintegrante, un tampón, un dispersante, un tensioactivo, un colorante, un saborizante, un edulcorante o similar de acuerdo con la necesidad. La composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente invención se puede preparar usando un procedimiento comúnmente utilizado en la técnica.

50 El ingrediente activo de la composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente invención puede variar dependiendo de la edad, el sexo, el peso corporal, las condiciones patológicas y la gravedad de los sujetos a los que se va a administrar el ingrediente activo y la vía de administración o determinación de prescriptores. La

determinación de una dosis adecuada basada en estos factores puede estar dentro del intervalo conocido por los expertos en la técnica, y una dosis diaria de la composición farmacéutica puede variar, por ejemplo, de 0,1 µg/kg/día a 100 g/kg./día, en particular, de 10 µg/kg/día a 10 g/kg/día, más particularmente, de 100 µg/kg/día a 1 g/kg/día, incluso más particularmente, de 500 µg/kg/día hasta 100 mg/kg/día. Cuando se muestra una diferencia en los efectos de acuerdo con la dosis, la dosis diaria puede ajustarse adecuadamente. La composición farmacéutica de acuerdo con una realización de la presente invención puede administrarse de una a tres veces al día, pero la presente invención no se limita a ello.

Una preparación de la composición de acuerdo con una realización de la presente invención no está particularmente limitada y puede formularse como, por ejemplo, un comprimido, un gránulo, un polvo, una preparación líquida, una preparación sólida o similar. Cada preparación puede prepararse formulando ingredientes comúnmente usados en la técnica además del ingrediente activo o seleccionando y mezclando apropiadamente los ingredientes por un experto en la materia sin dificultad indebida de acuerdo con el propósito de uso. Además, cuando se usan simultáneamente con otras materias primas, los ingredientes pueden tener un efecto sinérgico.

La composición que incluye el péptido de acuerdo con una realización de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar una o más enfermedades asociadas a inflamación seleccionadas del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), septicemia, choque por endotoxinas, hepatitis y diabetes tipo 1.

La composición que incluye el péptido de acuerdo con una realización de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar la fibrosis inducida por uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer, administración de un fármaco contra el cáncer y exposición a radiación.

La composición farmacéutica para prevenir o tratar la fibrosis que incluye el péptido de acuerdo con una realización de la presente invención puede exhibir un efecto de inhibición de la fibrosis de tejidos celulares de cáncer seleccionados del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, melanoma y cáncer de ovario.

La composición que incluye el péptido de acuerdo con una realización de la presente invención puede usarse como una composición farmacéutica para prevenir o tratar y aliviar una enfermedad de la piel seleccionada del grupo que consiste en arrugas de la piel, sequedad de la piel, depresiones de la piel, quemaduras epidérmicas, laceraciones epidérmicas, heridas epidérmicas y combinaciones de las mismas; o agravamiento de los mismos.

Una realización de la presente invención proporciona una composición cosmética que incluye el péptido o una sal del mismo. La composición cosmética incluye un medio o base cosmética o dermatológicamente aceptable. La composición cosmética puede estar en cualquier forma adecuada para aplicación local, por ejemplo, una solución, un gel, un sólido, un producto anhidro en pasta, una emulsión obtenida dispersando una fase oleosa en una fase acuosa, una emulsión obtenida dispersando una fase acuosa en una fase oleosa, una emulsión múltiple, una suspensión, una microemulsión, una microcápsula, microgránulos, dispersantes de vesículas iónicas (liposomas) y no iónicas, una espuma y un aerosol o parche que contiene además un propulsor comprimido. Estas preparaciones se pueden preparar de acuerdo con un procedimiento comúnmente utilizado en la técnica.

La composición cosmética incluye preferiblemente otros ingredientes capaces de impartir un efecto sinérgico al efecto principal dentro de un intervalo que no afecte adversamente al efecto principal, además de los materiales descritos anteriormente, y se pueden mezclar con otros ingredientes además del ingrediente activo, seleccionado apropiadamente por un experto en la técnica sin ninguna dificultad indebida de acuerdo con las preparaciones de otras composiciones cosméticas o el propósito de uso de las mismas. Por ejemplo, la composición cosmética de la presente invención puede incluir, además del ingrediente activo, otros ingredientes mezclados en una composición cosmética general de acuerdo con las necesidades, y ejemplos de los mismos incluyen ingredientes oleosos y grasos, un agente humectante, un agente emoliente, un tensioactivo, pigmentos orgánicos e inorgánicos, polvos orgánicos, un absorbente ultravioleta, un conservante, un bactericida, un antioxidante, un estabilizador, un espesante, glicerina, un ajustador de pH, alcoholes, colorantes, un pigmento, saborizantes, un promotor de la circulación sanguínea, un agente enfriador, un antitranspirante y agua purificada. Otros ingredientes mezclados que pueden incluirse en la composición cosmética no se limitan a los ejemplos anteriores, y las cantidades de mezcla de los ingredientes pueden estar dentro de un intervalo que no afecte negativamente a los objetivos y efectos de la presente invención.

Las preparaciones de la composición cosmética no están particularmente limitadas y pueden seleccionarse apropiadamente para el propósito de uso. Por ejemplo, la composición cosmética puede estar en forma de una o más preparaciones seleccionadas del grupo que consiste en preparaciones tipo jabón, tónico para la piel, loción nutritiva, esencia, crema nutritiva, crema de masaje, mascarilla, gel, base de maquillaje, maquillaje de fondo, polvo, lápices labiales, parches, aerosol, crema para los ojos, esencia para los ojos, crema limpiadora, espuma limpiadora, agua limpiadora, un limpiador, champú para el cabello, acondicionador para el cabello, tratamiento para el cabello, esencia para el cabello, loción para el cabello, tónico capilar para el cuero cabelludo, esencia para el cuero cabelludo, gel para

el cabello, atomizador para el cabello, mascarilla para el cabello, loción corporal, crema corporal, aceite corporal y esencia corporal, pero la presente invención no se limita a los ejemplos anteriores.

Las preparaciones de una composición alimenticia de acuerdo con la presente memoria descriptiva no están particularmente limitadas, pero la composición alimenticia se puede formular en, por ejemplo, comprimidos, gránulos, polvos, un líquido tal como una bebida, caramelo, gel, una barra, o similar. La composición alimenticia de cada preparación puede incluir ingredientes mixtos comúnmente usados en la técnica además del ingrediente activo, seleccionados apropiadamente por un experto en la técnica sin ninguna dificultad de acuerdo con las preparaciones o el propósito de uso, y, cuando estos ingredientes así como otras materias primas se aplican simultáneamente, se pueden obtener efectos sinérgicos.

En la composición alimenticia de acuerdo con la presente memoria descriptiva, la dosis del ingrediente activo puede ser determinada por los expertos en la técnica, y una dosis diaria de la composición alimenticia puede no estar limitada a, por ejemplo, 0,1 mg/kg/día a 5.000 mg/kg/día, más particularmente, 50 mg/kg/día a 500 mg/kg/día, y puede variar dependiendo de varios factores tales como edades de los sujetos a administrar, condiciones de salud y complicaciones.

La composición alimenticia de acuerdo con la presente memoria descriptiva puede ser, por ejemplo, una variedad de alimentos tales como chicles, productos de caramelo, dulces, helados, confitería, productos para bebida tales como bebidas alcohólicas o alimentos funcionales saludables que incluyen vitaminas, y minerales.

Además, la composición alimenticia de acuerdo con una realización de la presente invención puede incluir diversos suplementos nutricionales, vitaminas, minerales (electrolitos), sabores tales como sabores sintéticos, sabores naturales, colorantes y potenciadores (queso, chocolates), ácido péctico y sus sales, ácido algínico y sus sales, ácidos orgánicos, un espesante coloidal protector, un ajustador de pH, un estabilizador, un conservante, glicerina, alcoholes y un agente carbonatante usado en bebidas carbonatadas. Además, las composiciones alimenticias funcionales de la presente invención pueden incluir pulpa para la preparación de zumos de frutas naturales, bebidas de zumos de frutas y bebidas vegetales. Estos ingredientes se pueden usar solos o se puede usar una combinación de los mismos. La proporción de estos aditivos no es muy importante, pero las cantidades de los aditivos generalmente oscilan entre 0 partes en peso y aproximadamente 20 partes en peso con respecto a 100 partes en peso de la composición de la presente invención.

Los términos utilizados en la presente memoria descriptiva se proporcionan únicamente para describir realizaciones particulares y no pretenden limitar la presente invención. Los términos que no mencionan si el sustantivo es singular o plural no pretenden limitar el número, sino que indican que el sustantivo mencionado existe en forma singular o plural. Los términos "que incluye", "que tiene" y "que comprende" se interpretan como términos abiertos (es decir, que incluyen, pero no se limitan a los mismos).

Hacer referencia a un intervalo de valores es una manera fácil de evitar mencionar individualmente cada valor separado dentro del intervalo y, a menos que se indique lo contrario en el presente documento, cada valor separado se incorpora en la presente memoria descriptiva como si se mencionara individualmente en el presente documento. Los valores límite de todos los intervalos están dentro de los intervalos y pueden combinarse de forma independiente.

Todos los procedimientos mencionados en el presente documento se pueden realizar en un orden adecuado a menos que se indique lo contrario o que el contexto lo contradiga claramente. El uso de cualquier realización y todas las realizaciones o expresiones ejemplares (por ejemplo, "tal como") pretende describir más completamente la presente invención y no pretende limitar el alcance de la presente invención a menos que esté dentro de las reivindicaciones. Cualquier expresión en la memoria descriptiva no debe interpretarse de manera que cualquier elemento no reivindicado sea esencial para la práctica de la presente invención. A menos que se defina lo contrario, los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece la invención.

Las realizaciones ejemplares de la presente invención incluyen el mejor modo conocido por los inventores para implementar la presente invención. Las variaciones de las realizaciones ejemplares pueden resultar obvias para los expertos en la técnica después de leer la descripción anterior. Los inventores de la presente invención esperan que un experto en la técnica utilice apropiadamente tales variaciones y esperan que la presente invención se lleve a cabo de una manera diferente a la descrita en el presente documento. Por lo tanto, la presente invención incluye equivalentes y todas las modificaciones de la materia objeto de la invención mencionada en las reivindicaciones adjuntas, según lo permitido por las leyes de patentes. Aunque la presente invención se ha descrito en detalle con referencia a realizaciones ejemplares de la misma, los expertos en la técnica entenderán bien que se pueden realizar varios cambios en la forma y los detalles sin apartarse del alcance de la invención definidas por las reivindicaciones que se mencionan más adelante.

[Modo de realizar la invención]

A continuación, se describirán con más detalle las constituciones y los efectos de la presente invención con referencia a los Ejemplos y Ejemplos Experimentales. Sin embargo, estos Ejemplos y Ejemplos Experimentales se proporcionan

con fines ilustrativos únicamente para ayudar a comprender la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la presente invención.

Ejemplo 1: Síntesis de péptidos novedosos

Se prepararon péptidos novedosos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 (en lo sucesivo, denominados "Pep-WH-1 a Pep-WH-10 y Pep-WH-12") de acuerdo con un procedimiento generalmente conocido de síntesis de péptidos en fase sólida. El péptido denominado "Pep-WH-11" como se menciona en el presente documento tiene una secuencia de aminoácidos que no se divulga en la presente solicitud y que es diferente de los péptidos de las SEQ ID NOS: 1-10 y 12.

En particular, los péptidos Pep-WH-1 a Pep-WH-10 y Pep-WH-12 se sintetizaron mediante síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) con Fmoc utilizando ASP48S (Pepton, Inc., Daejeon, Corea) mediante acoplamiento de aminoácidos uno por uno desde el terminal C. Se utilizó un complejo en el que el primer aminoácido en el terminal C de cada uno de los péptidos estaba unido a una resina. Por ejemplo:

Resina de NH₂-Lys(Boc)-2-cloro-tritilo
Resina de NH₂-Ala-2-cloro-tritilo
Resina de NH₂-Arg(Pbf)-2-cloro-tritilo

Todos los aminoácidos usados en la síntesis de péptidos fueron protegidos por Trt, Boc, t-butiléster (t-Bu), 2,2,4,6,7-pentametil-dihidro-benzofuran-5-sulfonilo (Pbf), o similares, mientras que el terminal N estaba protegido por Fmoc, y todos los residuos se eliminaron en ácido. Por ejemplo, los aminoácidos fueron los siguientes:

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Glu(OtBu)-OH, Fmoc-Pro-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Thr(tBu)-OH, Fmoc-Lys(Boc)-OH, Fmoc-Gln(Trt)-OH, Fmoc-Trp(Boc)-OH, Fmoc-Met-OH, Fmoc-Asn(Trt)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, Fmoc-Ahx-OH, Fmoc-Gln-OH y Trt-ácido mercaptoacético.

Se utilizó hexafluorofosfato de 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilamonio (HBTU)/N-hidroxibenzotriazol (HOBt)/4-metilmorfolina (NMM) como reactivo de acoplamiento. Fmoc se eliminó usando piperidina al 20% en DMF. Cada péptido sintetizado se separó de la resina y los grupos protectores de los residuos se eliminaron usando un cóctel de escisión [ácido trifluoroacético (TFA)/triisopropilsilano (TIS)/etanoditiol (EDT)/H₂O = 92,5/2,5/2,5/2,5].

Cada péptido se sintetizó repitiendo un proceso de reacción de un aminoácido correspondiente con un soporte sólido al que se unió un aminoácido de partida con un grupo protector unido al mismo, seguido de lavado con un disolvente y luego desprotección. El péptido sintetizado se separó de la resina y se purificó con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), y luego se identificó por LC/MS si el péptido se sintetizó o no, seguido de liofilización.

Como resultado de realizar HPLC en el péptido usado en la presente realización, la pureza de todos los péptidos fue del 95% o más.

Un proceso de preparación del péptido Pep-WH-1 se describirá ahora en detalle como sigue.

1) Acoplamiento

Se disolvieron 8 equivalentes del aminoácido protegido y HBTU (8 equivalentes)/HOBt (8 equivalentes)/NMM (16 equivalentes) como reactivo de acoplamiento en DMF y se añadieron a la resina NH₂-A-2-cloro-tritilo y luego se permitió que ocurriera la reacción entre ellos a temperatura ambiente durante 2 horas, y el producto de reacción se lavó con DMF, MeOH y DMF en este orden.

2) desprotección de Fmoc

Se añadió piperidina al 20% en DMF al producto resultante, se dejó que ocurriera una reacción entre ellos a temperatura ambiente dos veces durante 5 minutos, seguido de lavado con DMF, MeOH y DMF en este orden.

3) Se repitieron las reacciones de 1) y 2) para preparar de ese modo la resina NH₂-A-L-S(tBu)-S(tBu)-R(Pbf)-L-R (Pbf)-A-2-cloro-tritilo como cadena principal del péptido.

4) Escisión: la resina peptídica de síntesis completa se trató con un cóctel de escisión para separar el péptido de la resina.

5) Se añadió éter dietílico refrigerante a la mezcla obtenida y luego se centrifugó la mezcla resultante para precipitar el péptido obtenido.

6) El péptido crudo obtenido en el proceso anterior se separó y purificó usando HPLC preparativa. Se utilizó como columna una columna Vydac Everest C18 (250 mm x 22 mm, 10 µm). Como eluyente, se utilizó un gradiente lineal de agua-acetonitrilo (10% a 75% (v/v) de acetonitrilo) que contenía ácido trifluoroacético al 0,1% (v/v).

7) Se confirmó mediante LC/MS (serie Agilent HP 1100) si el péptido separado se sintetizó para tener la secuencia deseada.

8) Se confirmó mediante HPLC analítica si el péptido, cuyo peso molecular había sido identificado, se separó y purificó hasta una pureza del 95% o superior, seguido de liofilización, para preparar Pep-WH-1 como un polvo blanco.

Se prepararon 11 péptidos de Pep-WH-2 a Pep-WH-12 usando el mismo procedimiento que se usó para preparar el péptido Pep-WH-1, excepto que la cadena principal de Pep-WH-1 se reemplazó por el secuencia correspondiente de cada péptido.

Ejemplo 2: actividad antiinflamatoria de los péptidos novedosos

5 Para verificar la actividad antiinflamatoria de cada uno de los péptidos novedosos Pep-WH-1 a Pep-WH-12, se midió un grado de expresión de TNF- α conocido como citoquina, que muestra actividad inflamatoria en una línea celular, cuya inflamación había sido inducida con lipopolisacárido (LPS), para cada péptido usando RT-qPCR y ELISA.

Preparación de reactivos y materiales experimentales

10 Se llevó a cabo un experimento utilizando células THP-1 (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, EE.UU.), que es una línea celular de leucemia monocítica aguda humana. Las células THP-1 se suspendieron en medio RPMI 1640 hasta una concentración de 1×10^5 células por pocillo en una placa de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas. En este momento, las células THP-1 se trataron con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma) para diferenciarlas en macrófagos.

15 Se disolvió lipopolisacárido (LPS, Sigma) en solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se disolvió PMA en dimetilsulfóxido (DMSO).

20 Los péptidos Pep-WH-1 a Pep-WH-12 se sintetizaron en Pepton (Daejeon, Corea) de acuerdo con el procedimiento de síntesis usado en el Ejemplo 1 y se utilizaron.

Método experimental

25 El procedimiento de prueba RT-qPCR fue el siguiente. Se sembraron células THP-1 en una placa de 6 pocillos a una concentración de 2×10^6 células/pocillo y se trataron con 100 ng/ml de PMA durante 24 horas para diferenciarlas en macrófagos. Los medios se retiraron y las células THP-1 diferenciadas se lavaron dos veces con medio sin suero (SFM), y luego cada péptido novedoso se trató con 10 ng/ml de LPS a cada concentración de 1 μ M, 5 μ M y 10 μ M, durante 6 horas. El ARN se extrajo utilizando el mini kit RNeasy® Plus (Qiagen), y el ARN extraído se cuantificó y luego se realizó la síntesis del ADNc usando un sistema de transcripción inversa (Promega). Se realizó RT-qPCR usando un sistema CFX96 en tiempo real (Bio-Rad) para analizar la expresión de ARNm de TNF- α , y se usó GAPDH como gen de referencia. Se realizaron 40 ciclos de PCR en las siguientes condiciones: a 95 °C durante 15 segundos, a 55 °C durante 30 segundos y a 72 °C durante 30 segundos), y las secuencias de cebadores usadas se muestran en la Tabla 3 a continuación.

35 <Tabla 3>

Gen	Secuencia directa (5'-3')	Secuencia inversa (5'-3')
TNF- α	CTATCTGGGAGGGGTCTTCC (SEQ ID NO: 13)	ATGTTTCGTCCTGCTCACAG (SEQ ID NO: 14)
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT (SEQ ID NO: 15)	CCCCACTTGATTTTGGAGG GA (SEQ ID NO: 16)

40 El procedimiento de prueba ELISA fue el siguiente. Se subcultivó y preparó THP-1, que es una línea celular de monocitos distribuida de ATCC, en la etapa P3, y la línea celular se distribuyó en los pocillos de una placa de pocillos y se trató con PMA para diferenciarlas en macrófagos. Las células diferenciadas se trataron con LPS para inducir una reacción inflamatoria (para inducir la producción de TNF-alfa) y se trataron con cada uno de los péptidos novedosos a cada concentración (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M), y las cantidades de TNF- α se midieron mediante ELISA. Se calcularon los valores relativos para un grupo sin inflamación y un grupo con inflamación completo, y el estrógeno (E2) se estableció como control positivo y una línea celular no tratada, no tratada con los péptidos novedosos se estableció como control general para realizar un análisis comparativo. E2 se conoce como un esteroide que inhibe la producción de TNF- α en THP-1.

Procesamiento estadístico

50 Todos los datos se expresan como media \pm error estándar de la media (S.E.M.), y el procesamiento estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA. Se utilizó un programa estadístico SigmaStat y el análisis estadístico se realizó mediante una prueba de Kruskal-Wallis y una prueba U de Mann-Whitney. Además, la comparación entre los grupos se realizó mediante una prueba de Tukey y se determinó como estadísticamente significativo un valor p menor a 0,05.

Resultados experimentales y análisis

55 Los resultados medidos por el procedimiento experimental son los siguientes.

60 Como resultado de comparar, mediante RT-qPCR, las tasas de inhibición del ARNm de TNF- α , lo que indica la actividad antiinflamatoria de cada péptido a través de una cantidad de expresión de ARNm de TNF- α cuando las células THP-1 en las que se produce una reacción inflamatoria se habían inducido con LPS se trataron con cada uno de los péptidos novedosos a cada concentración (1 μ M, 5 μ M y 10 μ M), todos los péptidos exhibieron una actividad

antiinflamatoria dependiente de la concentración del 50% o más a 10 μM , y Pep-WH-11 exhibió la actividad antiinflamatoria más alta a 1 μM , que es la concentración de tratamiento más baja (véase la Figura 1).

Como resultado de confirmar la capacidad de las células THP-1 para inhibir la producción de TNF- α mediante ELISA para evaluar las actividades antiinflamatorias de los péptidos novedosos, se mostró un bajo grado de expresión de TNF- α , es decir, actividad inductora de inflamación, en todos los casos tratados con los péptidos novedosos a una concentración de 0,5 μM , en comparación con un control no tratado que no se trató con los péptidos novedosos (véase la Figura 2). Cuando se comparó con E2 utilizado como control positivo, entre los péptidos novedosos, Pep-WH-8, Pep-WH-9, Pep-WH-11 y Pep-WH-12 exhibieron una menor actividad inductora de inflamación a todas las concentraciones.

A través de los resultados de los dos experimentos, se puede confirmar que los péptidos novedosos de acuerdo con la presente invención exhiben actividad antiinflamatoria, confirmada por la inhibición de TNF- α . El experimento para la inhibición de TNF- α se conoce como el experimento más básico para verificar los efectos globales inhibidores de la inflamación, mediante el cual se confirma que los péptidos novedosos de la presente invención pueden tener efectos globales antiinflamatorios.

Ejemplo 3: actividad antifibrótica de los péptidos novedosos

Para identificar un efecto inhibidor de TGF- β , considerado como la principal causa de fibrosis, de los péptidos novedosos Pep-WH-1 a Pep-WH-12, se llevó a cabo un experimento para confirmar la acción inhibidora de señalización de TGF- β en una línea celular HepG2 como sigue.

Preparación de reactivos y materiales experimentales

Los reactivos y materiales usados en el presente experimento son los siguientes. Los péptidos novedosos en polvo se disolvieron en agua estéril filtrada a través de 0,2 μm y luego se almacenaron en forma de alícuotas a -70 $^{\circ}\text{C}$ y, cuando estaban en uso, se descongelaron los péptidos almacenados. Se usó una línea celular HepG2 (ATCC HB-8065; American Type Culture Collection) y se disolvió TGF- β humano recombinante en HCl 4 mM para preparar una solución madre de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Se usó SB431542 (Sigma) como control positivo después de prepararse en una solución madre 10 mM.

Preparación de la línea celular

Se sembraron 2 x 10⁶ células HepG2 (ATCC HB-8065) en una placa Petri de 60 mm y luego se cultivaron en una incubadora de CO₂ durante 16 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó por un medio sin suero (SFM) y se cultivó adicionalmente durante 24 horas. Posteriormente, el medio se reemplazó con 10 ng/ml de TGF- β 1, y las células HepG2 se trataron con cada uno de los péptidos novedosos a cada concentración (1 μM y 10 μM) y luego se cultivaron durante 72 horas. Los grupos tratados con los péptidos novedosos respectivos se cultivaron adicionalmente en una incubadora de CO₂ a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora.

Método experimental

Para medir las actividades antifibróticas de los péptidos novedosos, se llevó a cabo un experimento para medir el grado de inhibición de la señalización de TGF- β mediante transferencia Western, y la descripción detallada del procedimiento experimental es la siguiente.

Las células tratadas con cada péptido se lavaron dos veces con PBS, se recogieron en un tubo EP de 1,5 ml usando un raspador de células y luego se centrifugaron usando un separador centrífugo (1.000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$, 2 minutos) para eliminar el sobrenadante, y luego se añadieron 100 μl de cada uno a las células HepG2 tratadas con RIPA. Las células HepG2 se incubaron en hielo durante 40 minutos y luego se mezclaron agitando cada 10 minutos (vórtice, microcentrífuga previamente enfriada a 4 $^{\circ}\text{C}$) y cada muestra se mezcló de 40 a 50 veces con una jeringa de 1 ml. Por último, la mezcla resultante se centrifugó a 13.000 rpm durante 15 minutos y se utilizó el sobrenadante obtenido.

Se sometieron 30 μg de proteína a electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio al 8% (SDS-PAGE) para ser transferidos a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Millipore). Las membranas de PVDF se bloquearon con leche desnatada al 5% y se incubaron con anticuerpos primarios particulares. Los anticuerpos usados en este experimento son los siguientes: Smad 2/3 (60, 52 kDa, BSA al 5% 1:1.000, # 3102, Cell Signaling), pSmad 2/3 (Cell Signaling # 3102) y GAPDH (37 kDa, BSA al 5% 1:1.000, # 2118, Cell Signaling). Posteriormente, las membranas de PVDF se lavaron con solución salina tamponada con Tris que contenía Tween-20 al 0,1% (TBST) y luego se hicieron reaccionar con un anticuerpo anticonejo conjugado con HRP (fabricado por Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). Posteriormente, se realizó la detección de ECL (Amersham Pharmacia Biotech) y las imágenes adquiridas se analizaron mediante un analizador de imágenes (GE Healthcare, ImageQuant LAS 4000).

Para medir los efectos inhibidores de TGF- β , se usaron pSmad 2/3 y Smad 2/3 como marcadores de actividad de señalización de TGF- β , y se usó GAPDH como grupo de referencia en electroforesis. Se utilizaron los marcadores de actividad de señalización de TGF- β que se expresaron a una concentración alta cuando se inhibió el TGF- β .

5 Procesamiento estadístico

10 Todos los datos se expresan como media \pm S.E.M., y el procesamiento estadístico se realizó mediante una prueba ANOVA. Se utilizó el programa estadístico SigmaStat y el análisis estadístico se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney. Además, la comparación entre los grupos se realizó mediante una prueba de Tukey y se determinó como estadísticamente significativo un valor p menor a 0,05.

Resultados experimentales y análisis

15 Los resultados medidos por el procedimiento experimental son los siguientes.

20 Como resultado de la medición de los grados de inhibición de TGF- β de los péptidos novedosos a través de transferencia Western, se mostraron altos grados de expresión de los marcadores, exhibidos a medida que aumentaba la inhibición de TGF- β , en todos los casos tratados con los péptidos novedosos a una concentración de 10 μ M, en comparación con un grupo no tratado inducido por fibrosis tratado solo con TGF- β (véanse las Figuras 3 a 5). A partir de los resultados, se puede confirmar que el TGF- β se inhibió mediante el tratamiento con los péptidos novedosos. Además, en comparación con el caso del control positivo tratado con SB431542 10 μ M, los grupos tratados con Pep-WH-3, Pep-WH-4, Pep-WH-5, Pep-WH-6, Pep-WH-7 y Pep-WH-12 a 10 μ M exhibieron cada uno una mayor actividad inhibidora de TGF- β .

25 A partir de los resultados experimentales, se puede confirmar que los péptidos novedosos de acuerdo con la presente invención exhiben actividad antifibrótica mostrada por la inhibición de TGF- β . El experimento para la inhibición de TGF- β se conoce como un experimento de actividad antifibrótica ampliamente utilizado, mediante el cual se confirma que los péptidos novedosos de la presente invención pueden tener efectos de actividad antifibrótica.

30 Ejemplo 4: Actividad de cicatrización de heridas de péptidos novedosos

35 Para confirmar los efectos de cicatrización de heridas con los péptidos novedosos Pep-WH-8, Pep-WH-9, Pep-WH-11 y Pep-WH-12, se trató un modelo animal al que se le indujo una herida con cada uno de los péptidos novedosos, y luego se llevó a cabo un experimento para confirmar el efecto de cada péptido en la producción de colágeno necesario para una disminución en el tamaño de la herida y en un proceso de cicatrización de heridas como sigue.

Preparación de animales de experimentación

40 Se seleccionaron ratas Sprague-Dawley (SD) porque los ratones tienen pieles finas y es difícil inducir uniformemente una herida en ratones. Para excluir los efectos debidos a cambios hormonales, se seleccionaron ratas SD macho y se adquirieron ratas SD de 6 semanas de edad y se aclimataron durante aproximadamente 1 semana. Sin embargo, para obtener resultados experimentales con mayor precisión, se llevó a cabo un experimento después de que las ratas SD de 6 semanas cumplieran 11 semanas. Dado que los animales experimentales son sensibles a las respuestas olfativas y pueden atacar a otros individuos, los individuos se separaron unos de otros después de que se formaran las heridas, tal como 1 rata por cada jaula, y se observaron.

Método experimental

50 Se usó el siguiente procedimiento para formar una escisión de espesor total en los animales experimentales preparados. Para inducir la anestesia, se inyectó intraperitonealmente una mezcla de 10 mg/kg (peso corporal) de xilazina-HCl y 100 mg/kg (peso corporal) de ketamina HCl en los animales de experimentación o se administró la mezcla a los animales de experimentación mediante un sistema respiratorio de anestesia. Después de la inducción de la anestesia, los pelos del lomo del animal de experimentación colocado boca abajo se afeitaron limpiamente, el lomo se desinfectó con betadina y luego se realizó una escisión circular de espesor total en un sitio separado de la parte más alta del lomo a cada uno de los lados izquierdo y derecho a una distancia de aproximadamente 1 cm, utilizando un punzón de 16 mm. No se realizó un apósito por separado en los sitios de la herida.

60 El modelo animal inducido por escisión de espesor total se dividió en los siguientes grupos y se aplicó un fármaco a cada grupo inmediatamente después de la formación de la escisión y cada dos días. Para el procedimiento de aplicación, se ajustó un material a una concentración de 1 mg/ml, y luego, inmediatamente antes del experimento, el material se diluyó 10 veces a una concentración de 100 μ g/ml. Se aplicaron gota a gota 50 μ l del material en cada escisión.

- 65
- 1) Control: aplicar gota a gota 50 μ l de solución salina por escisión
 - 2) Grupo experimental 1: aplicar gota a gota 0,1 mg/ml de Pep-WH-8 en una cantidad de 50 μ l por escisión
 - 3) Grupo experimental 2: aplicar gota a gota 0,1 mg/ml de Pep-WH-9 en una cantidad de 50 μ l por escisión

- 4) Grupo experimental 3: aplicar gota a gota 0,1 mg/ml de Pep-WH-11 en una cantidad de 50 µl por escisión
 5) Grupo experimental 4: aplicar gota a gota 0,1 mg/ml de Pep-WH-12 en una cantidad de 50 µl por escisión.

Los grupos se observaron inmediatamente después de la formación de la escisión y el día 2, el día 4, el día 7, el día 9, el día 11 y el día 14 a partir de entonces y se fotografiaron. Cuando las heridas sanaron por completo, se registró la fecha de cicatrización de la herida. Generalmente, alrededor del día 9, comenzaron a aparecer individuos con el tamaño de las heridas disminuido al 5% de las heridas iniciales. Los sitios de la herida se fotografiaron con una regla, y luego las imágenes adquiridas se analizaron utilizando el programa Image J (NIH, EE. UU.) para calcular las áreas de la herida, y se compararon entre sí las áreas de la herida.

Se llevó a cabo una biopsia para la formación de colágeno extrayendo los sitios de la herida de los lados opuestos del lomo de cada uno de dos individuos del control y dos individuos de cada grupo experimental el día 3 y el día 5 después de la formación de la escisión. Para comparar si se sintetizó colágeno, cada grupo se sometió a tinción tricrómica de Masson y luego se obtuvieron los valores promedio de medición de la intensidad de fluorescencia.

Resultados experimentales y análisis

Al comparar cada grupo experimental con el control, los casos de Pep-WH-8 y Pep-WH-12 exhibieron un tamaño de herida más pequeño el día 3 después de inducir la escisión de espesor total que la del control (véanse las Figuras 6 y 9). Los casos de Pep-WH-9 y Pep-WH-11 exhibieron un tamaño de herida más pequeño el día 1 después de inducir la escisión de espesor total que la del control (véanse las Figuras 7 y 8). Al observar los grupos de control y experimentales el día 11, no hubo diferencia significativa entre los tamaños de las heridas y las heridas se curaron, pero un tamaño de herida más pequeño en cada grupo experimental que en el control en la etapa inicial después de la formación de la escisión puede indicar que los péptidos novedosos son eficaces en una etapa temprana de la formación de la escisión.

Además, en los resultados de observación de la formación de colágeno después de inducir la escisión, todos los grupos experimentales exhibieron una intensidad de fluorescencia promedio alta para la producción de colágeno, en comparación con el control (véase la Figura 10). Esto puede indicar que los péptidos novedosos aceleran la formación de colágeno necesaria cuando se cicatrizan los sitios de las heridas.

A partir de los resultados experimentales, se puede confirmar que los péptidos novedosos de acuerdo con la presente invención tienen la actividad de disminuir el área de formación de heridas y aumentar la síntesis de colágeno. A partir de este resultado, se confirma que los péptidos novedosos de la presente invención pueden tener un efecto de actividad de cicatrización de heridas.

Combinando todos los resultados de los Ejemplos Experimentales, los péptidos novedosos de acuerdo con la presente invención pueden tener efectos antiinflamatorios, antifibróticos y de cicatrización de heridas, y pueden usarse para desarrollar un agente terapéutico para prevenir o tratar la inflamación, la fibrosis y heridas y también desarrollar un medicamento para prevenir o tratar diversas enfermedades con inflamación y fibrosis y un medicamento para aliviar los síntomas de las mismas.

<110> GEMVAX & KAEL CO., LTD. KIM, Sang Jae

<120> Péptidos Novedosos y la Composición que los Comprende

<130> OF16P100PCT

<150> KR 10-2015-0073188

<151> 2015-05-26

<160> 16

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 8

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido Pep-WH-1

<400> 1

Ala Leu Ser Ser Arg Leu Arg Ala

1

5

5 <210> 12
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Péptido Pep-WH-12

10 <400> 12

Ala Leu Thr Ser Lys Leu Arg Phe
 1 5

15 <210> 13
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador directo de TNF- α

<400> 13
 ctatctggga ggggtcttc 20

25 <210> 14
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Cebador inverso de TNF- α

<400> 14
 atgtctgcc tgctcacag 19

35 <210> 15
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador directo de GAPDH

45 <400> 15
 agggctgctt ttaactctgg t 21

50 <210> 16
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

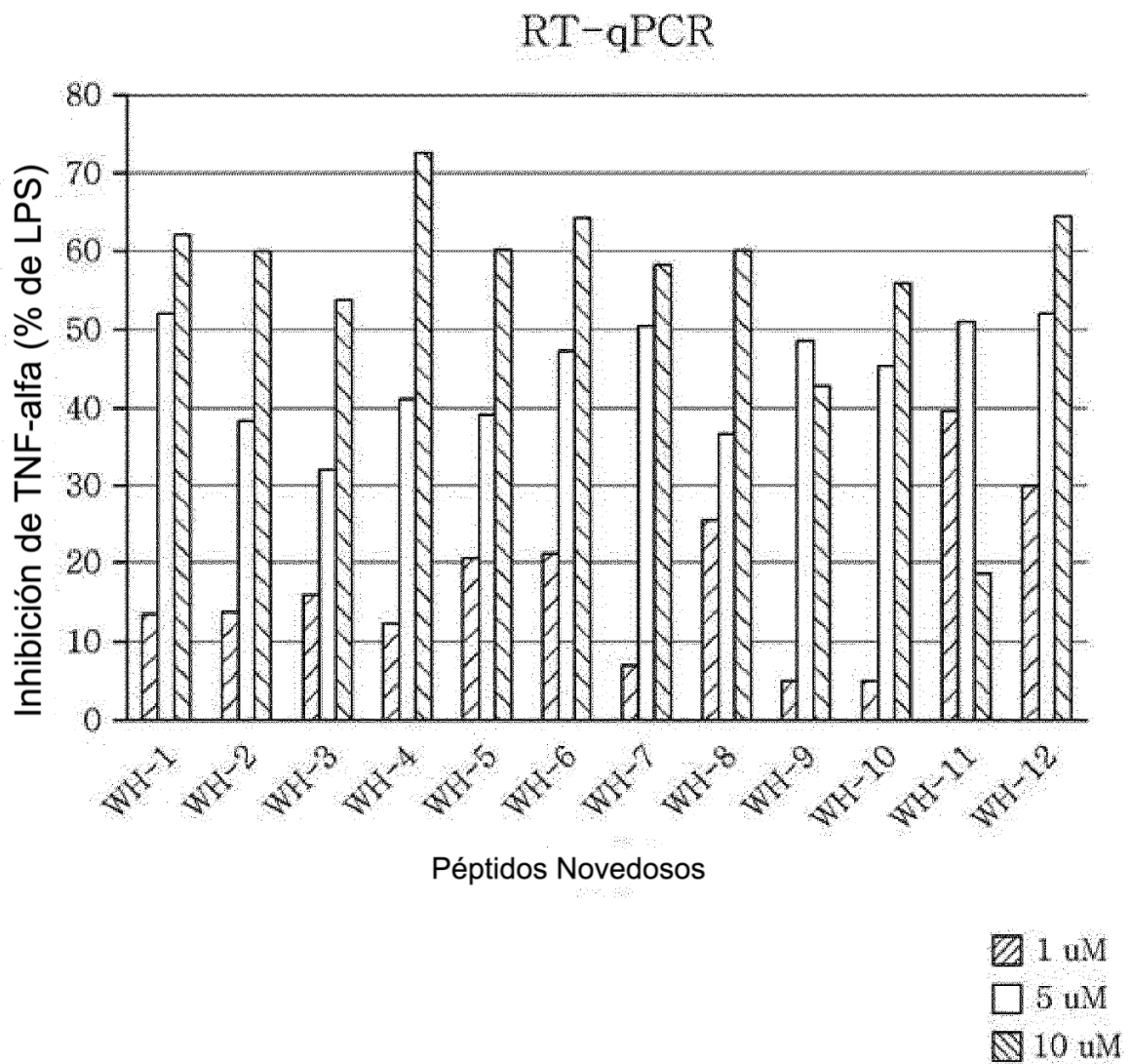
<220>
 <223> Cebador inverso de GAPDH

55 <400> 16
 cccactga ttttgaggg a 21

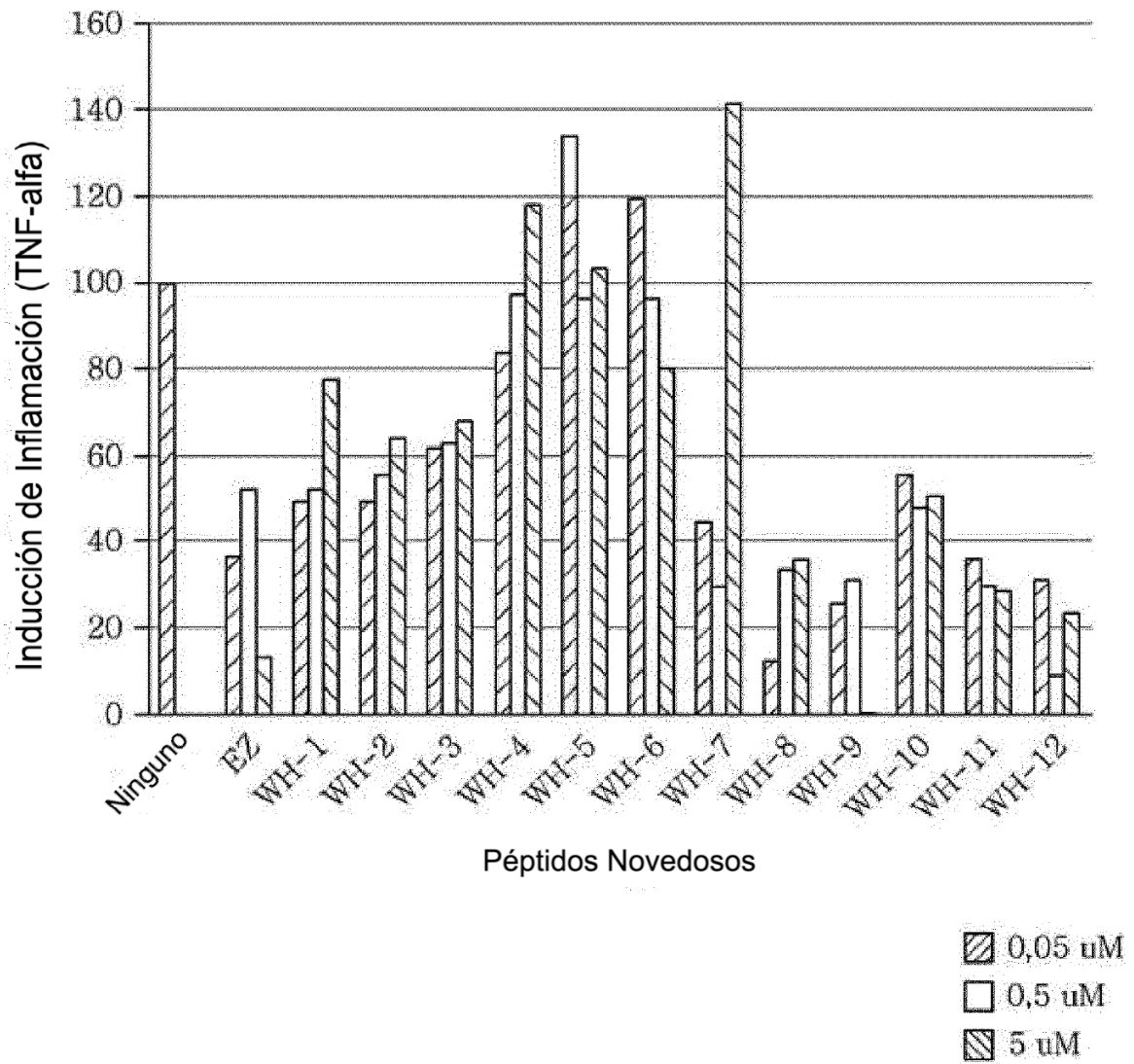
REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido seleccionado de un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos representada por una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12, siendo un péptido un fragmento de una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12, un péptido que tiene 80% o más homología de secuencia con una de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 o un fragmento de la misma, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, en la que el péptido tiene actividad antiinflamatoria, antifibrótica y de cicatrización de heridas.
- 10 2. Una composición antiinflamatoria que comprende uno o más de los péptidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 15 3. La composición antiinflamatoria de la reivindicación 2, en la que la composición antiinflamatoria tiene una actividad antiinflamatoria debido a una disminución de TNF- α .
- 20 4. La composición antiinflamatoria de la reivindicación 2 para uso en la prevención o el tratamiento de una o más enfermedades asociadas a la inflamación seleccionadas del grupo que consiste en artritis reumatoide, psoriasis, artritis psoriásica, dermatitis atópica, enfermedades inflamatorias del intestino tales como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, espondilitis anquilosante, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), septicemia, choque por endotoxinas, hepatitis y diabetes tipo 1.
- 25 5. Una composición para su uso en la prevención, el tratamiento o el alivio de la fibrosis de un órgano corporal, comprendiendo la composición uno o más de los péptidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 30 6. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que la composición para su uso en la prevención, el tratamiento o el alivio de la fibrosis de un órgano corporal tiene la actividad de inhibir la fibrosis de un órgano corporal mediante la inhibición de la señalización de TGF- β .
- 35 7. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que la composición para su uso en la prevención, el tratamiento o el alivio de la fibrosis de un órgano corporal previene o trata la fibrosis inducida por uno o más seleccionados del grupo que consiste en cáncer, administración de un fármaco contra el cáncer y exposición a la radiación.
- 40 8. La composición para el uso de la reivindicación 5, en la que la composición para su uso en la prevención, el tratamiento o el alivio de la fibrosis de un órgano corporal previene o trata la fibrosis de los tejidos celulares de cáncer seleccionados del grupo que consiste en cáncer de páncreas, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de mama, melanoma y cáncer de ovario.
- 45 9. Una composición para su uso en el tratamiento o el alivio de una herida, comprendiendo la composición uno o más de los péptidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1.
- 50 10. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que la composición para su uso en el tratamiento o alivio de una herida tiene un efecto de cicatrización de la herida al inducir la síntesis de colágeno.
- 55 11. La composición para el uso de la reivindicación 9, en la que la composición para su uso en el tratamiento o alivio de una herida trata o alivia una herida seleccionada del grupo que consiste en quemaduras epidérmicas, laceraciones epidérmicas, heridas epidérmicas y combinaciones de las mismas.
- 60 12. Una composición cosmética que comprende un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1.
- 65 13. Uso de una composición que comprende un péptido o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo de acuerdo con la reivindicación 1 como composición cosmética.
14. Una composición farmacéutica que comprende uno o más péptidos seleccionados de los péptidos que tienen secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOS: 1 a 10 y 12 como ingrediente activo.
15. Un kit para su uso en uno o más efectos seleccionados entre antiinflamatorios, antifibróticos, cicatrización de heridas, opcionalmente de acuerdo con una cualquiera o más de las reivindicaciones 4 a 11; comprendiendo el kit:
una composición que comprende uno o más de los péptidos o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos de acuerdo con la reivindicación 1, o la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2, 3 y 14; y
una instrucción que instruye uno o más seleccionados de una dosis, vía de administración, el número de dosis e indicaciones de la composición.

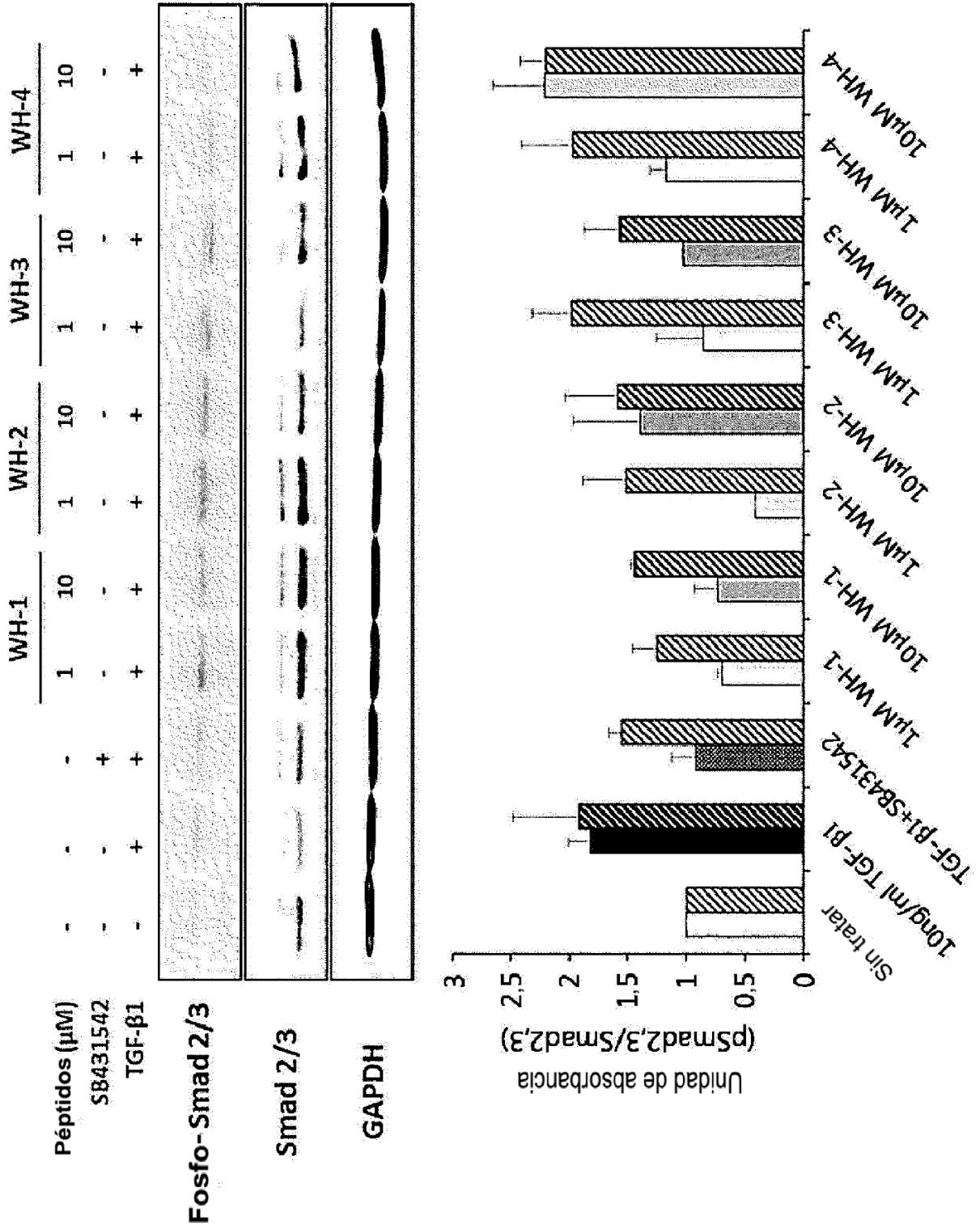
【Fig. 1】



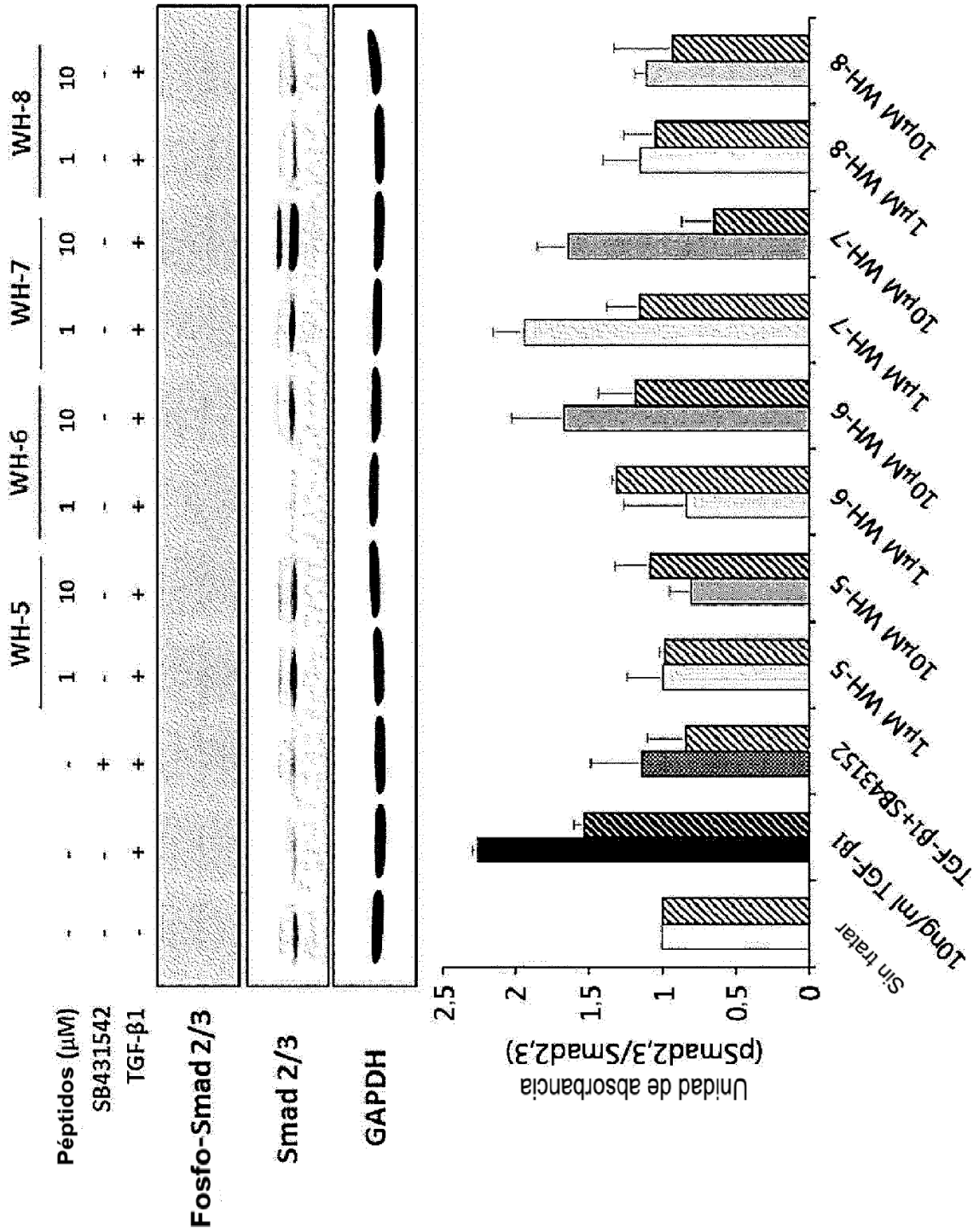
【Fig. 2】



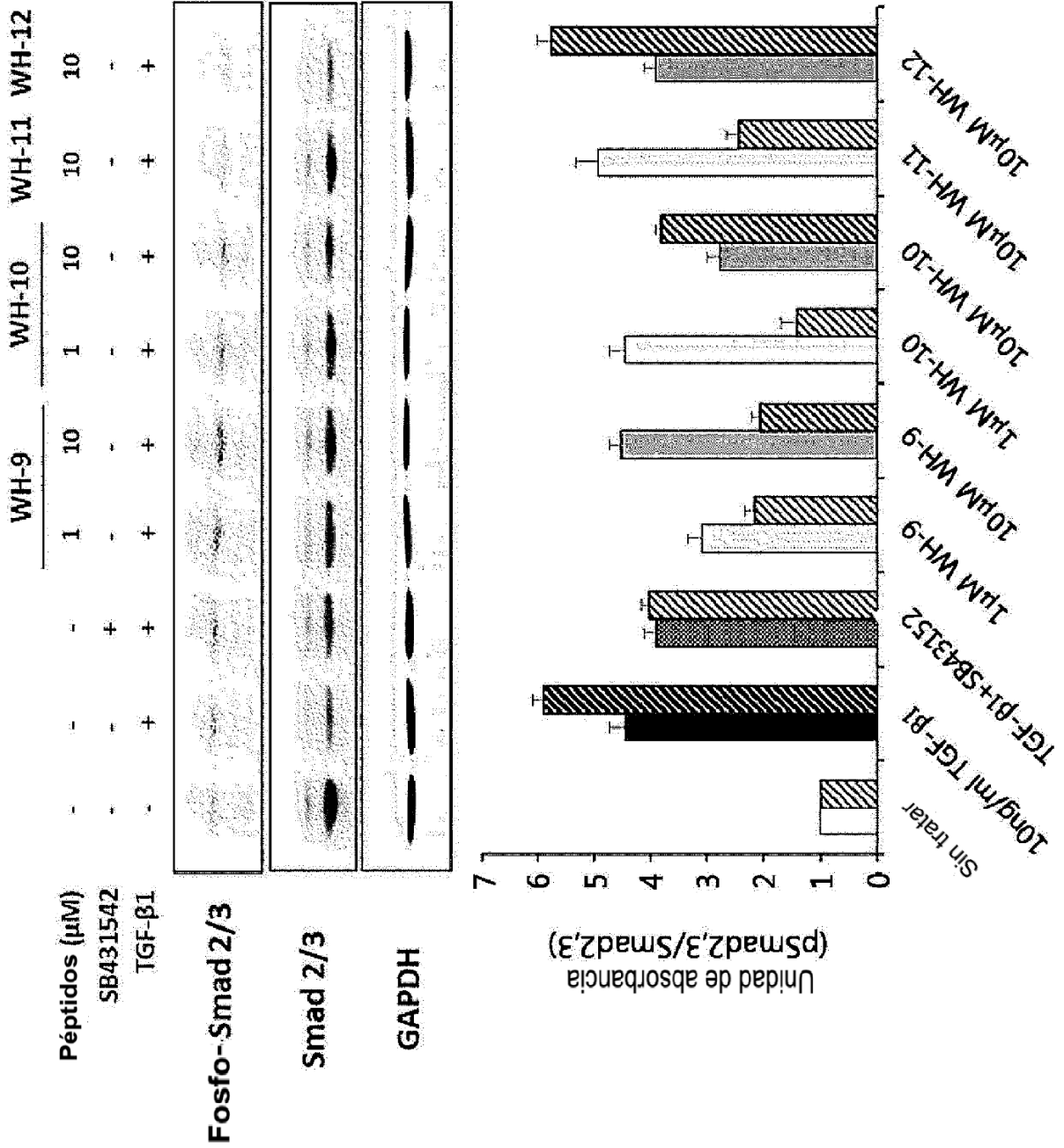
[Fig. 3]



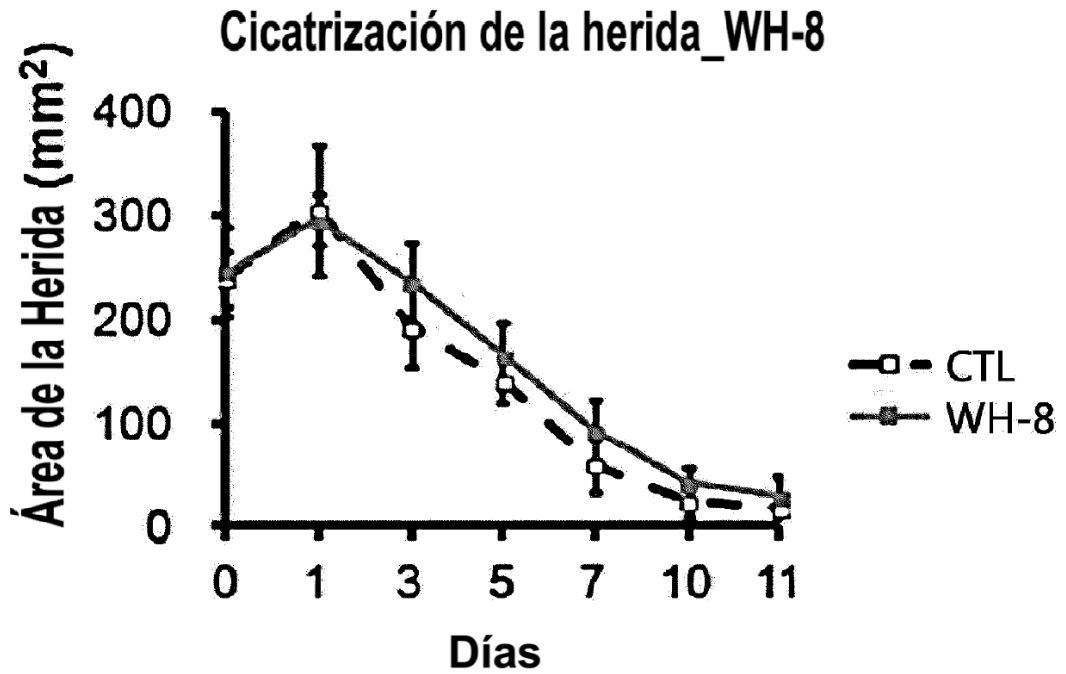
[Fig. 4]



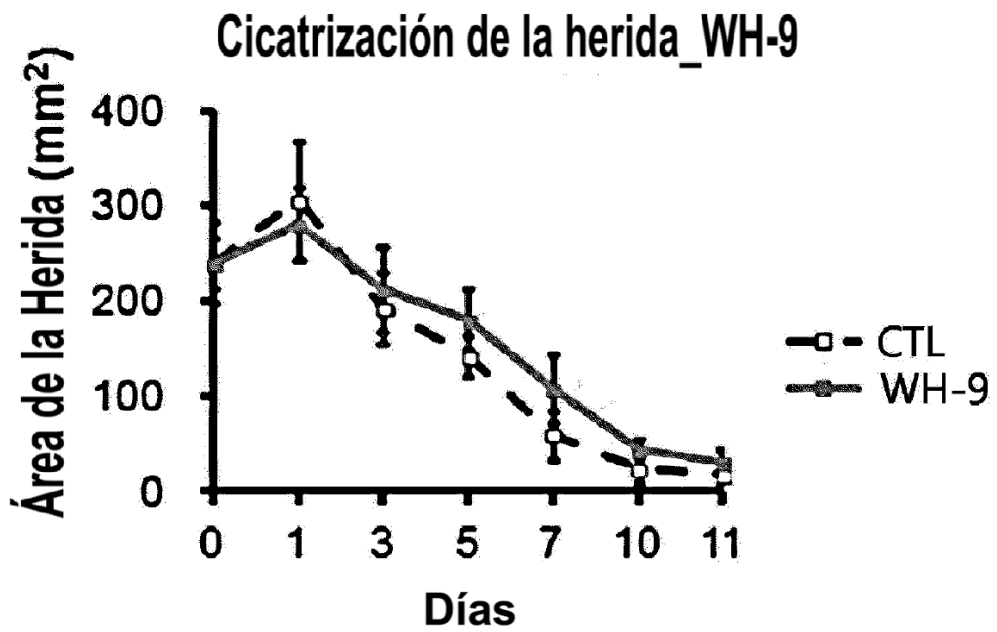
[Fig. 5]



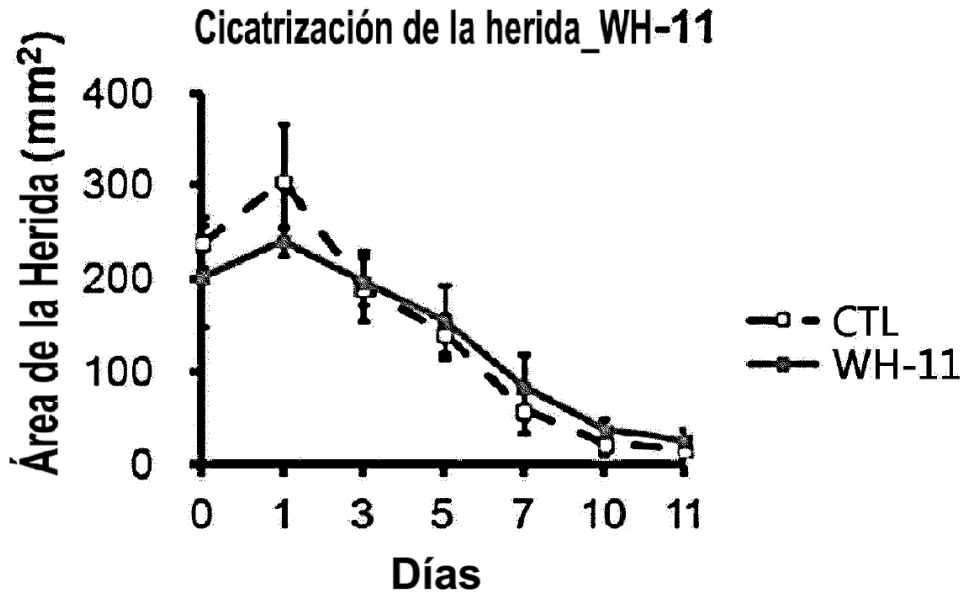
【Fig. 6】



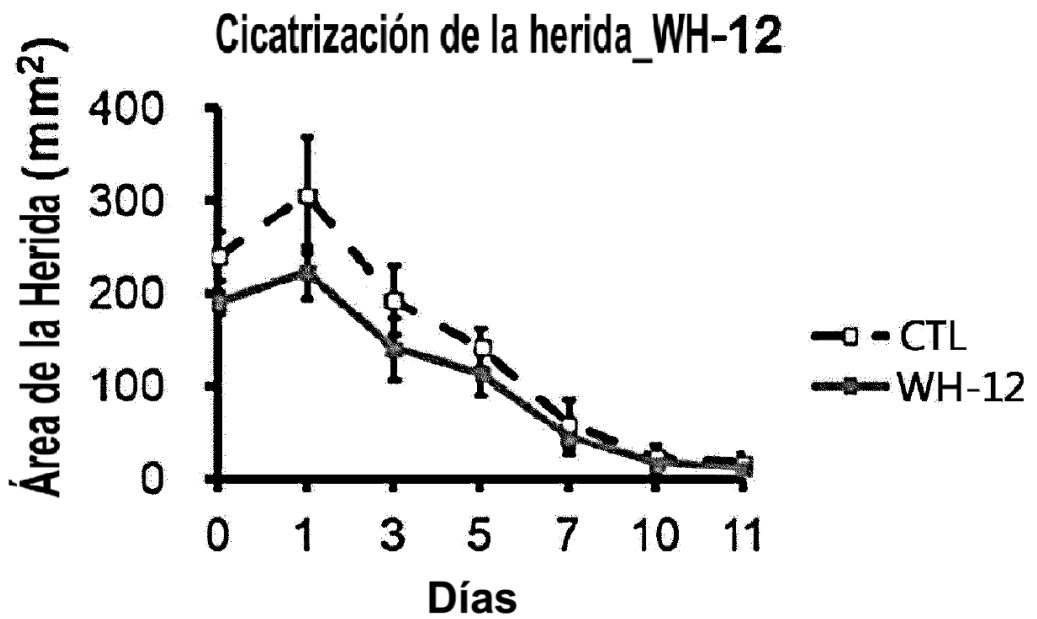
【Fig. 7】



【Fig. 8】



【Fig. 9】



【Fig. 10】

