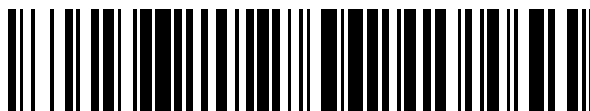


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 627 933**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61P 23/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 31/16 (2006.01)
C07K 14/81 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.05.2012** **PCT/CN2012/000725**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2013** **WO13173941**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.05.2012** **E 12877443 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2017** **EP 2855506**

54 Título: **Péptido y el uso del mismo**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.08.2017

73 Titular/es:

WELL RESOURCES LIMITED (100.0%)
10/F Cosco Tower Grand Millennium Plaza
Queen's Road Central 183 Hong Kong, CN

72 Inventor/es:

LIN, CHENLUNG

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 627 933 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptido y el uso del mismo

5 Campo de la invención

Esta divulgación se refiere a un péptido natural que tiene efectos analgésicos potentes y efecto contra el virus de la gripe, su polinucleótido codificador, la preparación y usos del mismo y una composición farmacéutica que contiene dicho péptido.

10 Antecedentes de la invención

El dolor es una sensación desagradable causada a menudo por estímulos intensos o dañinos. La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor ha definido de forma amplia "dolor" como "una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular real o potencial, o descrita en términos de dicho daño". (Pain 1979;6:247-8). El dolor es el motivo más común para la consulta médica en los Estados Unidos (Raj PP. Taxonomy and classification of pain. En: Niv D, Kreitler S, Diego B, Lamberto A. The Handbook of Chronic Pain. Nova Biomedical Books 2007). Es un síntoma importante en muchas afecciones y puede interferir significativamente con la calidad de vida y el funcionamiento general de una persona (Breivik H, Borchgrevink PC, Allen SM, Rosseland LA, Romundstad L, Hals EK, Kvarstein G, Stubhaug A. Assessment of pain. Br J Anaesth. 2008;101(1):17-24). En la mayoría de los casos, el dolor es habitualmente transitorio, durando solamente hasta que el estímulo nocivo se retira o el daño o la patología subyacente se ha curado. Sin embargo, algunas afecciones dolorosas, tales como artritis reumatoide, neuropatía periférica, cáncer y dolor idiopático, pueden persistir durante años. El dolor que dura mucho tiempo se denomina "crónico" y el dolor que se resuelve rápidamente se denomina "agudo". Tradicionalmente, la distinción entre dolor agudo y dolor crónico se ha basado en un intervalo arbitrario de tiempo desde la aparición; los dos marcadores más comúnmente usados son 3 meses y 6 meses desde el inicio del dolor (Turk DC, Okifuji A. Pain terms and taxonomies of pain. En: Bonica JJ, Loeser JD, Chapman CR, Turk DC, Butler SH. Bonica's management of pain. Hagerstown, MD: Lippincott Williams y Wilkins; 2001), aunque algunos investigadores han colocado la transición de dolor agudo a crónico a los 12 meses (Spanswick CC, Main CJ. Pain management: an interdisciplinary approach. Edimburgo: Churchill Livingstone 2000). Otros aplican "agudo" al dolor que dura menos de 30 días, "crónico" al dolor de más de seis meses y "subagudo" al dolor que dura de uno a seis meses (Thienhaus O, Cole BE. Classification of pain. En: Weiner R. Pain management: a practical guide for clinicians. Boca Ratón: CRC Press; 2002).

En los seres humanos, la detección del dolor periférico comienza en las terminaciones nerviosas libres. Los nociceptores polimodales y mecanorreceptores de alto umbral detectan estímulos nocivos tales como fuerzas mecánicas fuertes, H⁺, K⁺, productos químicos y temperatura. Tras la detección de los estímulos, la sensación de dolor se desplaza desde la periferia hasta la médula espinal (es decir, la vía espinotalámica), a continuación hace decusación y cruza a través de la comisura blanca anterior (en la médula espinal) antes de ascender de forma contralateral. Antes de llegar al cerebro, la vía espinotalámica se divide en la vía neoespinotalámica lateral y la vía paleoespinotalámica medial (Skevington, S. M. Psychology of pain. Chichester, Reino Unido: Wile 1995; pág.18), terminando posteriormente en el núcleo ventral posterolateral del tálamo, donde hacen sinapsis con las dendritas de la corteza somatosensitiva. Aparte de los estímulos nocivos que causan dolor, las lesiones de un nervio periférico en los seres humanos a menudo dan como resultado una afección de dolor neuropático persistente que se caracteriza por dolor espontáneo, generalmente ardor, alodinia (respuestas de dolor a estímulos no nocivos) e hiperalgesia (respuestas de dolor exagerado a estímulos nocivos). Aunque el tratamiento simpaticolítico a veces es eficaz para aliviar el dolor, lo que indica que el dolor neuropático al menos en parte se mantiene por la actividad en el sistema nervioso simpático, muchos pacientes no responden. La eficacia de los opioides para el dolor neuropático también es limitada (Rowbotham MC. Ann Neurol 1994;35:S46-S49), y algo controvertida.

El dolor agudo generalmente se controla con medicamentos tales como analgésicos y anestésicos. El control del dolor crónico o del dolor neuropático, sin embargo, es mucho más difícil. Muchos fármacos ayudan a aliviar el dolor agudo, y en general, se pueden dividir en fármacos no opioides y opioides. Los fármacos no opioides incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE), tales como ácido acetilsalicílico (aspirina) e inhibidores de la COX-2 (ciclooxigenasa-2). El término "no esteroide" en los AINE se usa para distinguir estos fármacos de los esteroideos, que, entre una amplia gama de otros efectos, tienen una acción antiinflamatoria depresora icosanoide similar. Como analgésicos, los AINE son no narcóticos inusuales. Los AINE están indicados generalmente para el tratamiento de afecciones agudas o crónicas donde el dolor y la inflamación están presentes.

La aspirina se usa a menudo como analgésico para aliviar dolores y molestias menores, como antipirético para reducir la fiebre o como medicamento antiinflamatorio. La aspirina funciona bien para el dolor sordo y pulsátil, pero es ineficaz para el dolor causado por la mayoría de los calambres musculares, hinchazón, distensión visceral e irritación cutánea aguda. Como analgésico posquirúrgico, la aspirina es inferior a uno de los AINE, el ibuprofeno, y tiene una mayor toxicidad gastrointestinal. Además, la aspirina también tiene muchas contraindicaciones y efectos indeseables; por ejemplo, el uso de aspirina debe ser cauteloso en personas con úlceras pépticas, diabetes leve o gastritis. Incluso si ninguna de estas afecciones está presente, todavía hay un riesgo aumentado de sangrado

estomacal. La otra categoría de AINE es el inhibidor selectivo de la COX-2 que selecciona como diana directamente a la COX-2, una enzima responsable de la inflamación y el dolor. La selectividad de la selección como diana de la COX-2 reduce el riesgo de ulceración péptica y es la función principal del celecoxib, rofecoxib y otros miembros de esta categoría de fármacos. Los inhibidores de la COX-2 también tienen efectos adversos, sobre todo un riesgo

5 aumentado de insuficiencia renal, y algunos resultados han mostrado un aumento en el riesgo de infarto de miocardio, trombosis y apoplejía por un aumento relativo de tromboxano. Cabe destacar que Rofecoxib (comúnmente conocido como Vioxx) se retiró del mercado en 2004 debido a estas preocupaciones.

Una categoría alternativa de analgésicos son los fármacos opioides. Un opioide es un producto químico psicoactivo

10 que actúa uniéndose a los receptores opioides, que se encuentran principalmente en el sistema nervioso central y periférico y en el tubo gastrointestinal. Los receptores en estos sistemas de órganos median tanto los efectos beneficiosos como los efectos secundarios de los opioides. Los efectos analgésicos de los opioides se deben a una percepción del dolor disminuida, reacción al dolor disminuida, así como a una tolerancia al dolor aumentada. Los opioides se han usado durante mucho tiempo para tratar el dolor agudo (tal como el dolor posoperatorio) y son muy

15 valiosos en los cuidados paliativos para calmar el dolor intenso, crónico e incapacitante de afecciones terminales tales como el cáncer y afecciones degenerativas tales como la artritis reumatoide. Sin embargo, los opioides se deben usar con mucha cautela en el dolor crónico no relacionado con el cáncer. No se requieren necesariamente dosis altas para controlar el dolor de enfermedades avanzadas o en fase terminal. Es muy probable que se produzca tolerancia (una reacción física que hace que el organismo responda menos a analgésicos y otros efectos), haciendo

20 que el opioide sea la última opción para controlar el dolor.

Del análisis anterior, está claro que existe una necesidad urgente de desarrollar una nueva clase de analgésicos eficaces no tolerantes y no sedantes para controlar tanto el dolor agudo intenso como el dolor crónico.

25 Se ha usado una mezcla de agentes bioactivos extraídos del tejido cutáneo de conejos con inflamación provocada por la inoculación del virus de la variolovacuna, que contiene inhibidores contra el sistema caliceíno-cinínico, para el tratamiento del dolor durante décadas (K. Ono, A. Inoue y M. Nakamuro. *Jpn Pharmacol Ther*, 1981;9:299-307). Los experimentos farmacológicos y clínicos mostraron que dicha mezcla de agentes bioactivos preparados a partir de la piel de conejo tiene efectos analgésicos contra todos los tipos de neuralgia sintomática, lumbago, colecistalgia,

30 angina, dolores de embolia arterial, dolores agudos de heridas, quemaduras y escaldaduras, dolores quirúrgicos o posquirúrgicos, dolor de úlcera péptica, dismenorrea, dolores de parto posteriores al parto, cefalea, dolores provocados por diversos tumores y así sucesivamente. Los estudios también mostraron que esta mezcla de agentes bioactivos puede promover eficazmente la activación de los macrófagos, inhibir significativamente la actividad anticomplemento en la reacción alérgica de tipo II. Los efectos tienen correlación lineal con las dosis. Por tanto, los

35 fármacos tienen efectos sobre la inhibición de la reacción inflamatoria correlacionada con la inmunidad y la mejora de la función de inmunidad. Además, después de una administración intraperitoneal continua de 28 días de los fármacos preparados a partir de la piel de conejo en ratas, no murieron ratas y no hubo cambios provocados por los fármacos en exámenes de orina, ojos, bioquímica sanguínea, patología y anatomía. Por lo tanto, dichos analgésicos tienen pocos efectos tóxicos (véase la solicitud de patente de EE. UU. número: 20110003009). El documento WO

40 2005/019434 divulga fragmentos que incluyen fragmentos de extremo N de alfa-1-antitripsina de mamífero y su uso para aliviar o mejorar el dolor asociado con enfermedades bacterianas tales como carbunco. El documento US 2008/261869 divulga composiciones de péptidos derivadas de alfa-1-antitripsina que tienen actividad de alfa-1-antitripsina pero ninguna actividad inhibidora significativa de la serina proteasa para su uso en la inhibición o

45 tratamiento de una infección bacteriana incluyendo dolor asociado con la infección bacteriana o una infección vírica tal como la gripe A.

Sin embargo, aunque la investigación de péptidos sobre el diseño de fármacos y el descubrimiento de fármacos es uno de los campos más prometedores en el desarrollo del nuevo fármaco, no hubo informes de que los investigadores en este campo se centraran en investigar los ingredientes proteínicos activos en la mezcla, aunque

50 dicha mezcla ha estado en el mercado durante varias décadas y con buenos efectos de analgesia. Por lo tanto, la identificación del/de los ingrediente(s) activo(s) ayudará a comprender el/los mecanismo(s) de actuación y la purificación de los componentes exactos responsables de los efectos analgésicos facilitará la preparación de fármaco(s) bien delineado(s) para uso clínico.

55 El virus de la gripe A es un género de la familia de virus *Orthomyxoviridae*. Se han aislado cepas de todos los subtipos del virus de la gripe A a partir de aves silvestres, aunque la enfermedad es infrecuente. Algunos aislados del virus de la gripe A causan una enfermedad grave tanto en las aves domésticas como, rara vez, en los seres humanos ("Gripe aviar" ("peste aviar") - Cartilla informativa. OMS.) Ocasionalmente, los virus se transmiten de aves acuáticas silvestres a aves domésticas, y esto puede causar un brote o dar lugar a pandemias de gripe humana (Klenk *et al.* (2008). "Avian Influenza: Molecular Mechanisms of Pathogenesis and Host Range". *Animal Viruses: Molecular Biology*. Caister Academic Press y Kawaoka Y, ed. (2006).

60

Influenza Virology: Current Topics. Caister Academic Press). Los virus de la gripe A son virus de ARN segmentados, monocatenarios y de sentido negativo. Existen varios subtipos, marcados de acuerdo con un número H (para el tipo

65 de hemaglutinina) y un número N (para el tipo de neuraminidasa). Existen al menos 16 antígenos H (H1 a H16) diferentes y nueve antígenos N (N1 a N9) diferentes. Diferentes virus de la gripe codifican diferentes proteínas de

hemaglutinina y neuraminidasa; por ejemplo, el virus H5N1 designa un subtipo de gripe A que tiene una proteína de hemaglutinina (H) de tipo 5 y una proteína de neuraminidasa (N) de tipo 1. Además, cada subtipo de virus ha mutado a una variedad de cepas con diferentes perfiles patógenos; algunos son patógenos para una especie pero no para otras y algunos son patógenos para múltiples especies. Teóricamente, son posibles 144 combinaciones diferentes de estas proteínas ("Virus de la gripe". Centros para el Control y Prevención de Enfermedades. 18 de noviembre de 2005). Algunas variantes se identifican y se nombran de acuerdo con el aislado al que se asemejan, por lo que se presume que comparten el linaje (ejemplo: similares al virus de la gripe de Fujian), de acuerdo con su huésped típico (ejemplo: virus de la gripe humana), de acuerdo con su subtipo (ejemplo: H3N2) y de acuerdo con su mortalidad (ejemplo: PP, poco patógeno). Por tanto, una gripe de un virus similar al aislado A/Fujian/411/2002 (H3N2) se denomina gripe de Fujian, gripe humana o gripe H3N2.

"Virus de la gripe humana" se refiere generalmente a los subtipos que se propagan ampliamente entre los seres humanos. Entre todas las cepas, H1N1, H1N2 y H3N2 son los únicos subtipos conocidos de virus de la gripe A que circulan actualmente entre los seres humanos (CDC, EE. UU.: Datos clave sobre la gripe aviar (peste aviar) y el virus de la gripe aviar A (H5N1). Los tratamientos para la gripe incluyen una gama de medicamentos y tratamientos que se usan en respuesta a la enfermedad de la gripe. Los tratamientos pueden seleccionar directamente el propio virus de la gripe; o en su lugar solo pueden ofrecer alivio a los síntomas de la enfermedad mientras el propio sistema inmunológico del organismo actúa para recuperarse de la infección (Montalto NJ, Gum KD, Ashley JV (2000). "Updated treatment for influenza A and B". Am Fam Physician 62 (11): 2467-76). Las dos clases principales de fármacos antiviricos usados contra los virus de la gripe son los inhibidores de la neuraminidasa, tales como zanamivir y oseltamivir, o los inhibidores de la proteína M2 vírica, tales como amantadina y rimantadina. Estos fármacos pueden reducir la gravedad de los síntomas si se toman poco después de la infección y también se pueden tomar para disminuir el riesgo de infección. Sin embargo, han surgido cepas víricas con resistencia a los fármacos para ambas clases de fármaco. Al igual que el desarrollo de la resistencia a antibióticos bacterianos, esto se puede resultar del uso excesivo de estos fármacos. Por ejemplo, en un estudio reciente se hizo hincapié en la necesidad urgente de potenciar las existencias de oseltamivir (Tamiflu) con fármacos antiviricos adicionales, incluido el zanamivir (Relenza), basándose en una evaluación de la eficacia de estos fármacos en el supuesto de que la neuraminidasa (NA) de la "gripe porcina" H1N1 de 2009 adquiriese la mutación de resistencia a tamiflu (His274Tyr) que está actualmente extendida en cepas estacionales de H1N1 (Venkataramanan Soundararajan, Kannan Tharakaraman, Rahul Raman, S. Raguram, Zachary Shriver, V. Sasisekharan, Ram Sasisekharan (2009). "Extrapolating from sequence - the 2009 H1N1 'swine' influenza virus". Nature Biotechnology 27 (6): 510-3). Otro ejemplo es en el caso de tratamiento con amantadinas, que puede conducir a la rápida producción de virus resistentes, y el uso excesivo de estos fármacos probablemente ha contribuido a la propagación de la resistencia (Lynch JP, Walsh EE, abril de 2007). "Influenza: evolving strategies in treatment and prevention". Semin Respir Crit Care Med 28 (2): 144-58).

Mientras tanto, sin embargo, han surgido y circulado algunas cepas resistentes a los inhibidores de la neuraminidasa en ausencia de un gran uso de los fármacos involucrados, y la frecuencia con la que aparecen cepas resistentes a fármacos muestra poca correlación con el nivel de uso de estos fármacos (Lackenby A, Thompson CI, Democratis J (diciembre de 2008). "The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza". Curr. Opin. Infect. Dis. 21 (6): 626-38). Los estudios de laboratorio también han mostrado que es posible contribuir al desarrollo de la resistencia a los fármacos por el uso de dosis subóptimas de estos fármacos como medida profiláctica (Lackenby A, Thompson CI, Democratis J (diciembre de 2008). "The potential impact of neuraminidase inhibitor resistant influenza". Curr. Opin. Infect. Dis. 21 (6): 626-38). La búsqueda de una clase más nueva de virus contra la gripe con potencia y menos efectos secundarios se ha convertido en un reto para la comunidad biomédica.

Sumario de la invención

Un propósito de la divulgación es proporcionar un péptido analgésico que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5, su variante y derivado. Sorprendentemente, este péptido también muestra actividad contra el virus de la gripe A.

Otro propósito de la divulgación es proporcionar polinucleótidos que codifican el péptido.

Todavía otro propósito de la divulgación es proporcionar la preparación y usos del péptido.

En un aspecto, la presente divulgación proporciona un péptido aislado que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5, sus variantes conservadas, sus fragmentos activos y sus derivados activos. Preferentemente, dicho péptido tiene la secuencia de aminoácidos de DEAQETAVSSHEQD como se muestra en SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que comparte al menos un 50 % de homología, por ejemplo, al menos un 60 % de homología, al menos un 70 % de homología, al menos un 80 % de homología o al menos un 90 % de homología, con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 y que posee la actividad analgésica y/o contra el virus de la gripe A.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene de una a siete (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) sustituciones de aminoácidos conservadas en comparación con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 y que posee la actividad analgésica y/o contra el virus de la gripe A.

En otro aspecto, el péptido divulgado en el presente documento, su variante y/o derivado se obtienen mediante síntesis química.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que comprende una secuencia de nucleótidos que comparte al menos un 50 % de homología con una secuencia de nucleótidos seleccionada del grupo que consiste en:

(a) una secuencia de nucleótidos que codifican un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5, su variante y/o derivado, y

(b) el polinucleótido complementario a la secuencia de nucleótidos de (a);

en el que dicho péptido, su variante y/o derivado posee la actividad analgésica y/o contra el virus de la gripe A.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido aislado que codifica un péptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un vector que comprende el polinucleótido anterior y una célula huésped transformada con el vector o polinucleótido.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para producir un péptido que tiene la actividad del péptido como se muestra en SEQ ID NO: 5, que comprende:

(a) cultivar la célula huésped transformada anterior en las condiciones de expresión;

(b) aislar el péptido de la presente invención a partir del cultivo.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona compuestos que estimulan, promueven y antagonizan la actividad del péptido como se muestra en SEQ ID NO: 5.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del péptido en el presente documento, su variante y/o derivado, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica se puede usar para tratar o aliviar las enfermedades y/o síntomas asociados con el dolor en un sujeto. Las enfermedades y/o síntomas asociados con el dolor en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, aquéllos seleccionados de todos los tipos de neuralgia sintomática, lumbago, colecistalgia, angina, dolores de embolia arterial, dolores agudos de heridas, quemaduras y escaldaduras, dolores quirúrgicos o posquirúrgicos, dolor de úlcera péptica, dismenorrea, dolores de parto posteriores al parto, cefalea, dolores provocados por diversos tumores. Esta composición farmacéutica también se puede usar para inhibir la actividad del virus de la gripe A en un sujeto. El virus de la gripe A en el presente documento se selecciona preferentemente de H5N1 y H1N1.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado, para su uso en el tratamiento de las enfermedades y/o síntomas asociados con dolor en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado, para su uso en la inhibición de la actividad del virus de la gripe A en un sujeto, que comprende la administración al sujeto de una cantidad eficaz de un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado, en la preparación de un medicamento para el tratamiento o remisión de las enfermedades y/o síntomas asociados con el dolor en un sujeto.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona el uso de un péptido en el presente documento, su variante y/o derivado en la preparación de un medicamento para la inhibición de la actividad del virus de la gripe A en un sujeto.

Los otros aspectos de la invención serán evidentes para el experto a la luz de la enseñanza de la divulgación.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos ilustran los modos de realización y no limitan el alcance de la invención definido en las

reivindicaciones.

Figura 1. Representación esquemática de los procedimientos usados para el cribado de agentes analgésicos peptídicos/a nivel de péptidos pequeños a partir de extractos brutos de las pieles de conejo inflamatorias provocadas por inoculación de la variolovacuna.

Figura 2. Identificación de péptido(s) funcional(es). Se muestra el espectro de EM/EM del ion doblemente cargado m/z 772,745. La secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 se determinó a partir de diferencias de EM en las series de iones fragmento y y b y los residuos emparejados 1-14 de la α 1-antiproteinasa de conejo.

Figura 3. El péptido 5 (SEQ ID NO: 5) tiene el efecto de alivio del dolor más superior que otros péptidos y es comparable a 1 mg de morfina, como lo muestra un retraso significativo en el inicio del dolor provocado por la inyección intraperitoneal de ácido acético (n=6). Nota: $p < 0,005$ entre el péptido 5 frente al péptido 1, 2, 3, 4 o 6; $p > 0,05$ entre el péptido 5 frente a la morfina; y el control: agua sola.

Figura 4. El péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 también causó una reducción significativa en el número total de contorsiones 30 minutos después de la inyección de ácido acético (n=6). Nota: $p < 0,01$ entre el péptido 5 frente al péptido 1, 2, 3, 4 o 6; $p > 0,05$ entre el péptido 5 frente a la morfina. Control: agua sola.

Figura 5. El péptido 5 poseía efectos analgésicos potentes de origen neurogénico. En la estimulación térmica, el tratamiento con inyección intraperitoneal de 2 mg de péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 (DEAQUETAVSSHEQD) redujo significativamente el dolor provocado por temperatura de la extremidad con lesión en el nervio ciático (hiperalgesia). Los datos se expresan como la media $\pm$ DE en tiempo (segundos). N=6. Nota: $**p < 0,005$ (por ANOVA) entre extremidad con lesión ipsilateral no tratada y tratada el día 5, 10 o 30.

Figura 6. El péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 poseía efectos potentes sobre la alodinia térmica de las extremidades con o sin lesión del nervio. En la estimulación mecánica, el tratamiento con inyección intraperitoneal de 2 mg de péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 redujo significativamente la alodinia térmica de la extremidad con lesión en el nervio ciático. Los datos se expresan como la media $\pm$ DE en el valor umbral de pelos de von Frey (en gramos). N=6 por punto temporal. Nota: $**p < 0,005$ (por ANOVA) entre extremidad con lesión ipsilateral no tratada y tratada el día 5, 10 o 30.

Figura 7. El péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 tiene efectos potentes en la inhibición de la replicación de los virus H5N1 y H1N1 *in vitro*. El péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 se disolvió en agua pura y se añadió (0, 0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 μ M) a las células MDCK en monocapa que se infectaron simultáneamente por diversas cepas de virus H5N1 (panel izquierdo) o H1N1 (panel derecho) a 5.000 UFP/ml. Después de 3 días, se contó el número de placas manualmente y se normalizó contra el control no tratado (es decir, 0 μ M).

Nota:

Para A/Vietnam/1194/04(H5N1):

(1) No hubo significación estadística entre sin tratamiento y tratamiento con 0,1 μ M

(2) $p < 0,01$ entre sin tratamiento y tratamiento con 1 μ M

(3) $p < 0,001$ entre sin tratamiento y tratamiento con 10 μ M

Mientras que tanto para A/Hong Kong/97(H5N1) como para A/ganso/Taichung/Q156/05(H5N1):

(1) $p < 0,05$ entre sin tratamiento y tratamiento con 0,1 μ M

(2) $p < 0,005$ entre sin tratamiento y tratamiento con 1 μ M

(3) $p < 0,001$ entre sin tratamiento y tratamiento con 10 μ M

Para H1N1/2009 pandémico:

(1) no hubo significación estadística entre sin tratamiento y 0,01 μ M

(2) $p < 0,05$ entre sin tratamiento y tratamiento con 0,1 μ M

(3) $p < 0,005$ entre sin tratamiento y tratamiento con 1 μ M

(4) $p < 0,001$ entre sin tratamiento y tratamiento con 10 μ M

Para A/Taiwán/01/86(H1N1):

(1) $p < 0,05$ entre sin tratamiento y tratamiento con $0,01 \mu\text{M}$

(2) $p < 0,01$ entre sin tratamiento y tratamiento con $0,1 \mu\text{M}$

(3) $p < 0,005$ entre sin tratamiento y tratamiento con $1 \mu\text{M}$

(4) $p < 0,001$ entre sin tratamiento y tratamiento con $10 \mu\text{M}$.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en el presente documento, el péptido con la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5 es un fragmento de la $\alpha 1$ -antiproteinasa F de conejo.

Como se usa en el presente documento, el término "aislado" se refiere a una sustancia que ha sido aislada del entorno original. Para sustancias naturales, el entorno original es el entorno natural. Por ejemplo, el polinucleótido y el péptido en un estado natural en las células viables no se aíslan o purifican. Sin embargo, si el mismo polinucleótido y péptido se han aislado a partir de otros componentes que los acompañan naturalmente, se aíslan o purifican.

El péptido de la divulgación puede ser un péptido recombinante, natural o sintético, preferentemente un péptido recombinante. El péptido de la divulgación puede ser un producto natural purificado o un producto sintetizado químicamente. De forma alternativa, se puede producir partir de huéspedes procarióticos o eucarióticos, tales como bacterias, levadura, plantas superiores, insectos y células de mamífero, utilizando técnicas recombinantes. De acuerdo con el huésped usado en la producción recombinante, el péptido puede ser glucosilado o no glucosilado.

Como se usa en el presente documento, los términos "derivado" y "variante" quieren decir el péptido que esencialmente retiene las mismas funciones biológicas o actividad del péptido natural con la secuencia de aminoácidos que se muestra en SEQ ID NO: 5.

Como se usa en el presente documento, el término "derivado" usado en el presente documento incluye, pero no se limita a, (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, (ii) uno en el que el péptido se fusiona con otro compuesto, tal como un compuesto para aumentar la semivida del péptido (por ejemplo, polietilenglicol), (iii) uno en el que los aminoácidos adicionales se fusionan al péptido, tal como una secuencia líder o secretaría o una secuencia usada para purificar péptido o proproteína, o (iv) uno en el que el péptido se modifica mediante algunas modificaciones. Dichos derivados son conocidos por los expertos basándose en las enseñanzas en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "modificaciones" (que normalmente no alteran la secuencia primaria) incluye derivación química *in vivo* o *in vitro* de péptidos, por ejemplo, acetilación o carboxilación. También se incluyen modificaciones de la glucosilación, por ejemplo, aquellas realizadas modificando los patrones de glucosilación de un péptido durante su síntesis y procesamiento o en las etapas de procesamiento adicionales, por ejemplo, exponiendo el péptido a enzimas de glucosilación (por ejemplo, enzimas glucosilantes o desglucosilantes de mamíferos). También se incluyen secuencias que tienen residuos de aminoácidos fosforilados, por ejemplo, fosfotirosina, fosfoserina, fosfotreonina, así como secuencias modificadas para mejorar la resistencia a la degradación proteolítica o para optimizar las propiedades de solubilidad.

Como se usa en el presente documento, el término "variante" incluye, pero no se limita a, delecciones, inserciones y/o sustituciones de varios aminoácidos, preferentemente varias sustituciones de aminoácidos conservadas (típicamente 1-7, preferentemente 1-6, más preferentemente 1-5, incluso más preferentemente 1-4, aún más preferentemente 1-3, lo más preferentemente 1-2), y adición de uno o más aminoácidos (típicamente menos de 20, preferentemente menos de 10, más preferentemente menos de 5) en el extremo C, el extremo N o dentro del péptido. Por ejemplo, las funciones proteicas generalmente no cambian cuando un residuo de aminoácido se sustituye por uno similar o análogo, por ejemplo, sustituido con un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo de aminoácido conservado). Además, la adición de uno o varios aminoácidos en el extremo C y/o el extremo N generalmente no cambia la función de la proteína.

Como se usa en el presente documento, el término "sustituciones de aminoácidos conservadas" quiere decir un péptido formado sustituyendo como máximo 7, preferentemente como máximo 6, más preferentemente 5 y lo más preferentemente como máximo 3 aminoácidos teniendo los aminoácidos sustancialmente una propiedad igual o similar, en comparación con la secuencia de aminoácidos de DEAQETAVSSHEQD. Preferentemente, estos mutantes conservados se forman mediante la sustitución de acuerdo con la tabla 1.

Tabla 1

Residuo inicial	Sustitución representativa
Asp (D)	Glu
Glu (E)	Asp
Ala (A)	Val; Leu; He
Gln (Q)	Asn
Thr (T)	Ser
Val (V)	He; Leu; Met; Phe; Ala
Ser (S)	Thr
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg

El polinucleótido de la invención puede estar en forma de ADN y ARN. El ADN incluye ADNc, ADN genómico y ADN sintético, etc., en forma monocatenaria o bicatenaria. El polinucleótido de la invención puede ser una secuencia degenerada. Como se usa en el presente documento, el término "secuencia degenerada" quiere decir que hay secuencias diferentes que codifican la misma proteína debido a la degeneración de codones.

El término "polinucleótido que codifica el péptido" incluye el polinucleótido que codifica dicho péptido y el polinucleótido que comprende una secuencia adicional y/o no codificadora. El polinucleótido que codifica el péptido en el presente documento puede prepararse mediante amplificación por PCR, procedimiento recombinante y procedimiento sintético. Para la amplificación por PCR, se pueden obtener dichas secuencias diseñando cebadores basados en la secuencia de nucleótidos divulgada en el presente documento, especialmente el ORF, y usando una biblioteca de ADNc disponible comercialmente o preparada mediante técnicas rutinarias en la técnica como molde. Una vez que se obtiene la secuencia, se pueden producir lotes de las secuencias por procedimientos recombinantes. Generalmente, dicha secuencia se clona en un vector que se transforma a continuación en una célula huésped. La secuencia se aísla a partir de las células huésped amplificadas usando técnicas convencionales.

La divulgación se refiere además a un vector que comprende el polinucleótido de la divulgación, una célula huésped genéticamente modificada transformada con el vector o el polinucleótido de la divulgación y el procedimiento para producir el péptido por técnicas recombinantes.

Los péptidos recombinantes se pueden expresar o producir mediante tecnología de ADN recombinante convencional (Science, 1984; 224: 1431), usando la secuencia polinucleotídica de la invención. En general, comprende las siguientes etapas:

(1) transfectar o transformar las células huésped apropiadas con el polinucleótido que codifica el péptido o el vector que contiene el polinucleótido;

(2) cultivar las células huésped en un medio apropiado;

(3) aislar o purificar la proteína a partir del medio o células.

Las secuencias polinucleotídicas en el presente documento se pueden insertar en un vector de expresión recombinante. El término "vector de expresión" quiere decir un plásmido bacteriano, bacteriófago, plásmido de levadura, virus de plantas o virus de células de mamífero, tal como adenovirus, retrovirus o cualquier otro vehículo conocido en la técnica. Se puede usar cualquier plásmido o vector para construir el vector de expresión recombinante siempre que pueda replicarse y sea estable en el huésped. Una característica importante del vector de expresión es que el vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor, un gen marcador así como los componentes reguladores de la traducción.

Los procedimientos conocidos se pueden usar para construir un vector de expresión que contiene la secuencia en el presente documento y componentes reguladores de transcripción/traducción apropiados. Estos procedimientos incluyen técnica de ADN recombinante *in vitro*, técnica de síntesis de ADN, técnica recombinante *in vivo*, etc. La secuencia de ADN está ligada eficazmente al promotor apropiado en un vector de expresión para dirigir la síntesis de ARNm. Los promotores ejemplares son promotor lac o trp de *E. Coli*; promotor PL del fago A; promotor eucariótico que incluye promotor temprano inmediato de CMV, promotor de timidina-cinasa de VHS, promotor SV40 temprano y tardío, RTL de retrovirus y algunos otros promotores conocidos que controlan la expresión génica en las células procariotas, células eucariotas o virus. El vector de expresión puede comprender además un sitio de unión al ribosoma para iniciar la traducción, el terminador de la transcripción y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "célula huésped" incluye procariota, por ejemplo, bacterias; eucariota primaria, por ejemplo, levadura; eucariotas avanzadas, por ejemplo, células de mamífero. Los ejemplos

representativos son células bacterianas, por ejemplo, *E. Coli*, *Streptomyces*, *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, por ejemplo, levadura; células vegetales; células de insecto, por ejemplo, *Drosophila* S2 o Sf9; células de animales, por ejemplo, CHO, COS o melanoma Bowes, etc.

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "efecto analgésico" incluye "efecto antihiperalgnesia" y "efecto antialodinia". Sin embargo, estos tres términos se podrían utilizar por separado porque indican alivio del dolor en diferentes enfermedades o modelo.

- 10 Como se usa en el presente documento, el término "el sujeto" incluye mamíferos humanos, no humanos (por ejemplo, vaca, oveja, conejo, perro, ratón, rata, mono, etc.) y aves domésticas.

- 15 La invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad segura y eficaz del péptido en el presente documento en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dicho vehículo incluye, pero no se limita a, solución salina, solución tampón, glucosa, agua, glicerina, etanol o la combinación de los mismos. La formulación farmacéutica debe ser adecuada para el procedimiento de administración. La composición farmacéutica puede estar en forma de inyecciones que se preparan por procedimientos convencionales, usando solución salina fisiológica u otra solución acuosa que contiene glucosa o sustancias auxiliares. Las composiciones farmacéuticas en forma de comprimido o cápsula se pueden preparar mediante procedimientos rutinarios. Las composiciones farmacéuticas, por ejemplo, inyecciones, soluciones, comprimidos y cápsulas, deben fabricarse en condiciones estériles. El ingrediente activo se administra en una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo, aproximadamente 1 ug-50 mg/kg de peso corporal o más por día. Además, el péptido de la invención se puede administrar junto con otros agentes terapéuticos.

- 25 La evidencia del experimento anterior muestra que el extracto en bruto de las pieles de conejo inflamatorias provocadas por la inoculación de la variolovacuna puede ejercer su efecto farmacológico sobre la analgesia. Para identificar los componentes exactos para el alivio del dolor, como se demuestra por su agente parental AGC®, se empleó un enfoque proteómico para determinar las diferencias en las proporciones de masa a carga (m/z) usando nano-CL-EM/EM. Mediante purificación química sofisticada y búsqueda de bases de datos, los inventores identificaron una secuencia peptídica de DEAQETAVSSHEQD que posee efectos potentes analgésicos, antihiperalgésicos, antialodínicos y contra el virus de la gripe A.

- 30 La invención se ilustra además mediante los siguientes ejemplos. Para los procedimientos experimentales en los siguientes ejemplos, se realizaron en condiciones rutinarias, por ejemplo, las descritas por Sambrook. *et al.*, en Molecule Clone: A Laboratory Manual, Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, o según instrucciones de los fabricantes, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1: Identificación del péptido

- 40 A. Preparación de muestras

- 45 La mezcla de los agentes bioactivos extraídos a partir de los tejidos de la piel de conejos con inflamación provocada por la inoculación del virus de la variolovacuna se preparó como se describe (Y. Imai, K. Saito, S. Maeda *et al.* Inhibition of the release of bradykinin-like substances into the perfusate of rat hind paw by neurotrophin. Jpn J Pharmacol 1984, 36:104-106) y se proporcionó por Vanworld Pharmaceutical Co Ltd, Rugao, China, con un nombre comercial de AGC® (10 U/ml, 25 ml/vial). Se secaron aproximadamente 200 µl de la preparación en bruto de AGC® en una centrifugadora de vacío. El material liofilizado se reconstituyó con 100 µl de tampón de bicarbonato de amonio 0,5 M (pH 8,5) que contenía urea 8 M y ditiotretitol (DTT) 0,5 M durante 1 hora a 37 °C y durante otras 2 horas a 4 °C en condiciones de oscuridad cuando se añadieron 10 µl de yodoacetamida 0,5 M (IAM) para alquilación. Posteriormente, las soluciones resultantes se digirieron a continuación con 0,2 µg de tripsina durante 18 h a 37 °C y a continuación las soluciones digeridas con tripsina se acidificaron con ácido trifluoroacético al 10 % (TFA)/H₂O hasta un valor de pH 3,0. Después de la reacción, las soluciones totalmente acidificadas se aplicaron sobre la columna de fase inversa C18 previamente equilibrada con 200 µl de TFA al 0,1 %/H₂O (pH 3,0). La columna también se lavó con 200 µl de TFA/H₂O al 0,1 % (pH 3,0) y después se eluyó con un gradiente de acetonitrilo por etapas de un 50 % a un 100 % en TFA al 0,1 % a temperatura ambiente.

B. Análisis de nano-CL-EM/EM

- 60 Las fracciones eluidas se recogieron, se secaron en una centrifugadora al vacío y después se reconstituyeron en 10 µl de ácido fórmico (AF) al 0,1 % en H₂O y se analizaron mediante LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San José, CA). La separación de nano-CL de fase inversa se realizó en un sistema de nanoflujo Agilent serie 1200 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Se cargó un total de 10 µl de muestra de la fracción en una precolumna Agilent Zorbax XDB C18 (0,35 mm, 5 µm), seguido de separación usando una columna C18 (d.i. 75 µm X 25 cm, 3 µm, Micro Tech, Fontana, CA). Las fases móviles usadas fueron (A) AF al 0,1 % y (B) AF al 0,1 % en ACN al 100 % .

Se aplicó un gradiente lineal de un 5 % a un 35 % (B) durante un periodo de 90 minutos a un caudal de 300 nl/min. Los péptidos se analizaron en el modo de iones positivos aplicando un voltaje de 1,8 kV a la aguja de inyección. El EM se operó en un modo dependiente de los datos, en el que se realizó una exploración completa con m/z 300-2000 en el Orbitrap (R = 60.000 a m/z 400) usando una velocidad de 30 ms/exploración. Se seleccionaron los seis picos más intensos de fragmentación con un valor energético de colisión normalizado de un 35 % en el LTQ. Se aplicó una duración de repetición de 30 s para excluir los mismos iones m/z de la reelección para fragmentación. El líquido reconstituido como control, también tratado por reducción, alquilación y desalación, se acidificó y se sometió a análisis de nano-CL-EM/EM como se mencionó anteriormente, excepto para la digestión con tripsina.

C. Búsqueda e identificación de bases de datos

Los péptidos se identificaron mediante listas de picos convertidas a partir de los espectros de nano-CL-EM/EM buscando en taxonomía animal en las bases de datos de NCBI, emparejamientos exactos usando el programa de búsqueda MASCOT (<http://www.matrixscience.com>, Hirosawa *et al.*, 1993). La tolerancia de la masa tanto del ion precursor como de los iones fragmento se fijó en 0,8 Da. Las búsquedas se realizaron para permitir la modificación fija como carbamidometilación (C) y sin tripsina como enzima. La identificación resultante tenía una puntuación de péptidos estadísticamente significativa ($P \leq 0,05$) (basada en los espectros combinados de EM y EM/EM) y la mejor puntuación de iones (basada en los espectros de EM/EM).

D. Resultados

Los patrones espectrales de masa de los fragmentos de proteína generados con o sin digestión con tripsina se usaron a continuación para compararlos con los de las proteínas previamente conocidas depositados en bancos de datos para confirmar las secuencias peptídicas que se pueden usar para la identificación de proteínas intactas. (ID de la proteína). Por lo tanto, se puede lograr una amplia cobertura de péptidos mediante análisis aleatorio, elucidar los perfiles de expresión de péptidos o péptidos pequeños e identificar secuencias así como la caracterización bioquímica. Un diagrama de flujo de los procedimientos usados en este trabajo y todos los péptidos identificados con su caracterización bioquímica se enumeran en la tabla 2. Se detectó el pico peptídico representativo a partir del análisis de EM/EM (fig. 2), dando como resultado una identificación confiable de proteínas mediante búsqueda con MASCOT. Se muestra el espectro de EM/EM del ion doblemente cargado m/z 772,745. La secuencia de aminoácidos DEAQETAVSSHEQD como se muestra en SEQ ID NO: 5, se determinó a partir de diferencias de EM en las series de iones fragmento y y b y se emparejó con los residuos 1-14 de la α 1-antiproteínasa F de conejo, que es diferente de la del ser humano, ratón o del ganado vacuno. Además, no comparte homología con los otros péptidos relacionados con la analgesia, incluyendo el agonista opiode DAGO. De acuerdo con la predicción computacional, es lineal y es poco probable que tenga estructuras como hélice α , lámina β , giro β o región plegada.

Tabla 2. Caracterización de seis péptidos pequeños identificados mediante espectros de EM/EM a partir de análisis de nano-CL-EM/EM.

Secuencia peptídica	IP/Masa (Da)
SEQ ID NO:1: DEAQETAVSSH (péptido 1)	4,13/1173,16
SEQ ID NO:2: DEAQETAVSSHE (péptido 2)	4,00/1302,27
SEQ ID NO:3: DEAQETAVSSHEQ (péptido 3)	4,00/1430,40
SEQ ID NO:4: EAQETAVSSHEQD (péptido 4)	4,00/1430,40
SEQ ID NO:5: DEAQETAVSSHEQD (péptido 5)	3,83/1545,49
SEQ ID NO:6: AQETAVSSHEQD (péptido 6)	4,13/1304,29

Ejemplo 2: Efectos analgésicos *in vivo*

Los péptidos se sintetizaron en una instalación comercial de Mission Biotech Co. (MB, Taipéi, Taiwán) usando la química del Fmoc de fase sólida y se purificaron mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa hasta una pureza de un >90 % y se validaron mediante EM. Los productos peptídicos finales se disolvieron en DMSO para su uso experimental.

Para el modelo de dolor visceral agudo en ratones, a ratones machos C57BL/6 que pesaban 20-25 g se les inyectó intraperitonealmente 1 mg de morfina (como control positivo) o péptido sintético 1-6 (SEQ ID NO: 1-6, 2 mg de cada uno). Treinta minutos después, a los ratones se les inyectó posteriormente 1 ml de ácido acético al 1 % intraperitonealmente. Se registró el inicio de la 1.^a contorsión y la frecuencia de contorsión en los 30 minutos siguientes.

El péptido 5 como se muestra en la SEQ ID NO: 5 (un péptido de 14 aminoácidos) tiene efectos analgésicos similares comparables a 1 mg de morfina como se muestra en la latencia tardía de retirada de la pata (fig. 3) y redujo

los episodios de contorsión totales medidos en 30 min (fig. 4).

Ejemplo 3: Efectos antihiperalgésicos

- 5 Se usaron ratones machos C57BL/6 que pesaban 20-25 g. Los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo anestesia con halotano (2-3 %). La lesión parcial del nervio ciático se realizó atando una ligadura ajustada con sutura de seda 9-0 alrededor de 1/3 a 1/2 del diámetro del nervio ciático, como se ha descrito (Malmberg AB y Basbaum AI. Pain 1998;76:215-222). En ratones con operación simulada, el nervio ciático se expuso pero no se ligó. Posteriormente, los ratones se habituaron al entorno de la prueba durante al menos 1 hora antes de la prueba
- 10 térmica y la prueba de pelos de von Frey. En la prueba térmica, se determinó la latencia de retirada de la pata como un indicador para el dolor. En la prueba de von Frey, se ajustó la intensidad del estímulo para dar una latencia de retirada de 10 segundos en el ratón normal, mientras que el valor de corte en ausencia de una respuesta fue de 20 segundos. Se evaluó la sensibilidad mecánica con pelos de von Frey mediante el paradigma de ascenso-descenso (Chaplan *et al*, J. Neurosci Methods 1994;53:53-66). El filamento para el paradigma de la prueba se eligió para ser
- 15 de 0,3 g.

- El péptido 5 como se muestra en la SEQ ID NO: 5 se sometió a prueba para determinar sus efectos antihiperalgnesia en ratones que recibían ligadura de nervio ciático. Los resultados de la prueba térmica de los ratones con operación simulada y los ratones con lesión en el nervio se compararon en paralelo el día 5, 10 y 30 después de la cirugía. Los
- 20 resultados demostraron claramente que las extremidades con lesión del nervio tenían hiperalgnesia, como se demuestra por las latencias de retirada de la pata significativamente reducidas, en comparación con la de la extremidad contralateral o las extremidades con operación simulada (fig. 5). Además, la inyección intraperitoneal de 2 mg de péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 (marcados como "tratados") de hecho podría aumentar significativamente la tolerancia al dolor provocado por calor, como se demuestra por un aumento de la latencia de
- 25 retirada de la pata (fig. 5), en comparación con los ratones de control que recibieron disolvente DMSO (marcados como "no tratados").

Ejemplo 4: Efectos antialodinia

- 30 Se usó el mismo modelo animal que en el ejemplo 3. El péptido 5 como se muestra en la SEQ ID NO: 5 se sometió a prueba en cuanto a sus efectos antialodinia en ratones que recibían ligadura de nervio ciático. Los resultados de la estimulación mecánica (prueba de von Frey) de los ratones con operación simulada y los ratones con lesión en el nervio se compararon en paralelo el día 5, 10 y 30 después de la cirugía. Los resultados demostraron claramente que las extremidades con lesión del nervio tenían hiperalodinia, como se demuestra por el valor umbral de von Frey
- 35 significativamente más bajo, en comparación con el de la extremidad contralateral o las extremidades con operación simulada (fig. 6). Además, la inyección intraperitoneal de 2 mg de péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 (marcados como "tratados") podría aumentar significativamente la tolerancia a los estímulos mecánicos, como se demuestra por un aumento del valor umbral de von Frey (fig. 6), en comparación con los ratones de control que recibieron agua pura (marcados como "no tratados").

40

Ejemplo 5: Efectos antivirales

A. Virus y células

- 45 Los aislados A/Vietnam/1194/04 y A/Hong Kong/97 de H5N1 se obtuvieron del Departamento de Microbiología de la Universidad de Hong Kong. Se usó el virus a 3×10^5 TCID₅₀ para los experimentos. También se usó A/Taiwan/01/86 (H1N1) a 3×10^5 TCID₅₀ para los experimentos. Los experimentos H5N1 se llevaron a cabo en una instalación de contención de nivel de bioseguridad (BSL) 3+. Se almacenaron alícuotas de virus de reserva a -80 °C. Se obtuvieron células de riñón canino Madin-Darby (MDCK) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, Va, EE. UU.) y
- 50 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 10 % y antibióticos al 1 % (penicilina/estreptomicina). Se determinó la dosis infecciosa de cultivo de tejido al 50 % (TCID₅₀) en células MDCK después de incubación a 37 °C durante 3 días y se calcularon los valores mediante el procedimiento de Reed y Muench (Reed LJ, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. American Journal of Hygiene. 1938;27:493-497). Para determinar la eficacia del péptido 5 como se muestra en SEQ
- 55 ID NO: 5 en la inhibición de la replicación del virus, se comparó el UFP/ml con (dividido por) el UFP/ml inicial que se sembró y se expresó como porcentaje del valor cuantitativo inicial (que era 5×10^3 UFP/ml).

B. Determinación del valor cuantitativo vírico mediante ensayo de placa

- 60 Todos los virus usados aquí se cuantificaron inicialmente en células MDCK para determinar el valor cuantitativo infeccioso (unidades formadoras de placa por ml, UFP/ml). En resumen, las células MDCK que se hicieron crecer en monocapas en placas de 24 pocillos se infectaron con el virus a 5×10^3 UFP/ml después del tratamiento con el péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 (0,001, 0,01, 0,1, 1 y 10 µM). Después de 1 h de unión a 37 °C en células MDCK confluentes, el virus no unido se lavó suavemente con PBS y se recubrió con Agar Noble 1:1 (1,8 %) y 2x DME-F12 (suplementado con Glutamax (Invitrogen, Carlsbad, CA), ITS (Invitrogen) y 3 µg/ml de tripsina
- 65 acetilada (Sigma, St. Louis, MO)). Después de dejar solidificar el agar, las placas se incubaron durante ~72 horas a

37 °C antes de fijar con violeta cristal y contando el número de placa en cada dilución. Después de 3 días, se contó el número de placas manualmente y se normalizó contra el control no tratado (es decir, 0 µM).

C. El péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 inhibe la replicación del virus de la gripe H5N1 y H1N1 *in vitro*

Para examinar los efectos inhibidores del péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 contra la replicación del virus de la gripe H5N1 y H1N1, el péptido sintético 5 diluido en serie como se muestra en SEQ ID NO: 5 se suplementó en el cultivo de células MDCK en monocapas en placas de 24 pocillos que habían sido expuestas a 5000 UFP/ml de H5N1 A/Vietnam/1194/04, A/Hong Kong/97 y A/ganso/Taichung/Q156/05 o H1N1. Después de 3 días, se contó el número de placas virales con cada concentración de fármaco y se normalizó el número de placa frente al control no tratado (fig. 7). Se mostró que el péptido 5 como se muestra en SEQ ID NO: 5 tiene efectos potentes en la inhibición de la replicación de los virus H5N1 y H1N1 *in vitro*.

Lista de secuencias

```

<110> WELL RESOURCES LIMITED
<120> UN PEPTIDO Y EL USO DEL MISMO
<130> FPCH12160031P
<160> 6
<170> PatentIn versión 3.3
<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(11)
<223> residuos 1-11 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
Asp Glu Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His
30 1 5 10
<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
35 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(12)
<223> residuos 1-12 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
Asp Glu Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His Glu
40 1 5 10
<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
45 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(13)
<223> residuos 1-13 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
Asp Glu Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His Glu Gln
50 1 5 10
<210> 4
<211> 13
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
55 <220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(13)
<223> residuos 2-14 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
Glu Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His Glu Gln Asp
60 1 5 10
<210> 5
<211> 14

```

```

<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<220>
<221> MISC_FEATURE
5 <222> (1)..(14)
<223> residuos 1-14 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
    Asp Glu Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His Glu Gln Asp
    1          5          10
<210> 6
10 <211> 14
<212> PRT
<213> Oryctolagus cuniculus
<220>
<221> MISC_FEATURE
15 <222> (1)..(12)
<223> residuos 3-14 de la alfa1-antiproteinasa F de conejo
<400> 1
    Ala Gln Glu Thr Ala Val Ser Ser His Glu Gln Asp
    1          5          10

```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido aislado que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5.
- 5 2. El péptido aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que posee actividad analgésica y/o contra el virus de la gripe A.
3. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que se obtiene por síntesis química.
- 10 4. Un polinucleótido seleccionado del grupo que consiste en:
 - (a) una secuencia de nucleótidos que codifica un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos como se muestra en SEQ ID NO: 5, y
 - 15 (b) el polinucleótido complementario a la secuencia de nucleótidos de (a);en el que dicho péptido posee actividad analgésica y/o contra el virus de la gripe A.
- 20 5. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad eficaz del péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
6. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso como medicamento.
- 25 7. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en el tratamiento o remisión de las enfermedades y/o síntomas asociados con el dolor en un sujeto.
- 30 8. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en el que las enfermedades y/o síntomas asociados con el dolor se seleccionan entre todos los tipos de neuralgia sintomática, lumbago, colecistalgia, angina, dolores de embolia arterial, dolores agudos de heridas, quemaduras y escaldaduras, dolores quirúrgicos o posquirúrgicos, dolor de úlcera péptica, dismenorrea, dolores de parto posteriores al parto, cefalea y dolores provocados por diversos tumores.
- 35 9. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2 para su uso en la inhibición de la actividad del virus de la gripe A en un sujeto.
10. El péptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el virus de la gripe A se selecciona de H5N1 y H1N1.
- 40 11. El péptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7-10, en el que el sujeto se selecciona de seres humanos, mamíferos no humanos y aves domésticas.

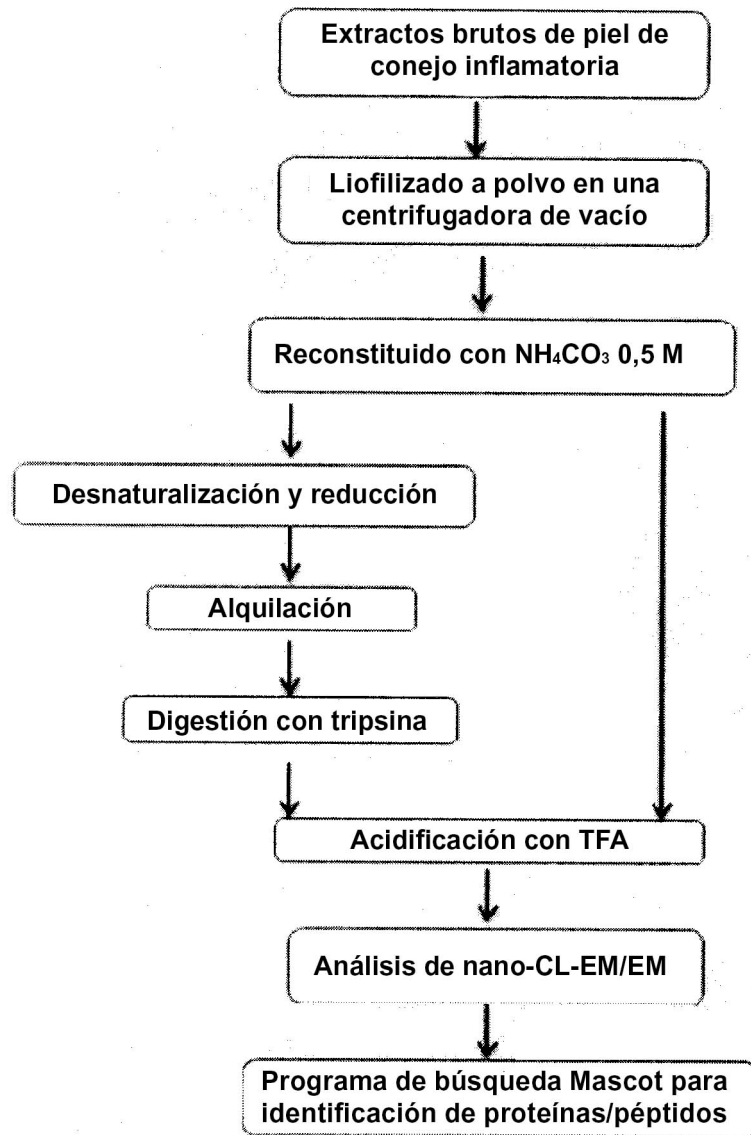


Fig. 1

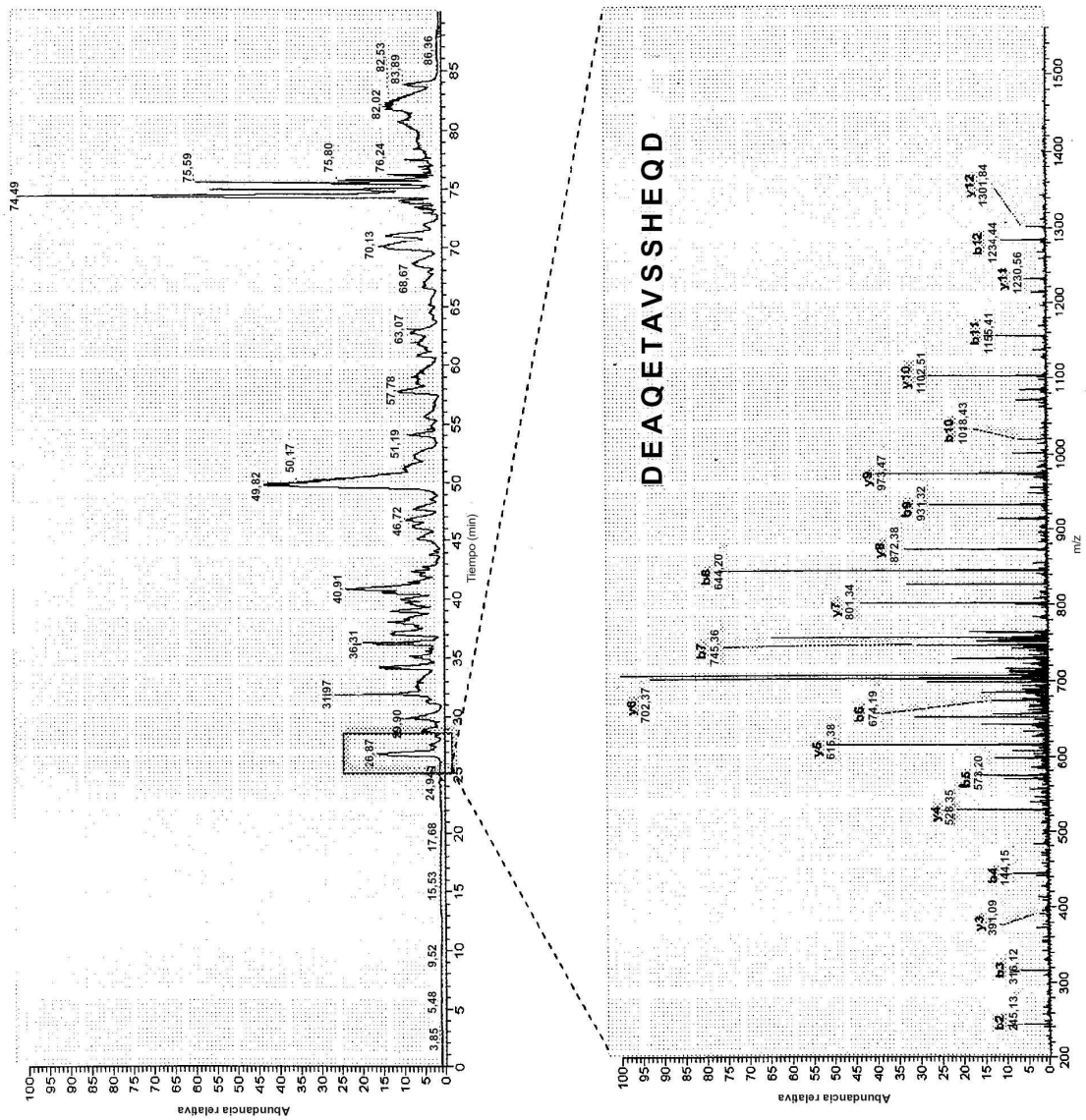


Fig.2

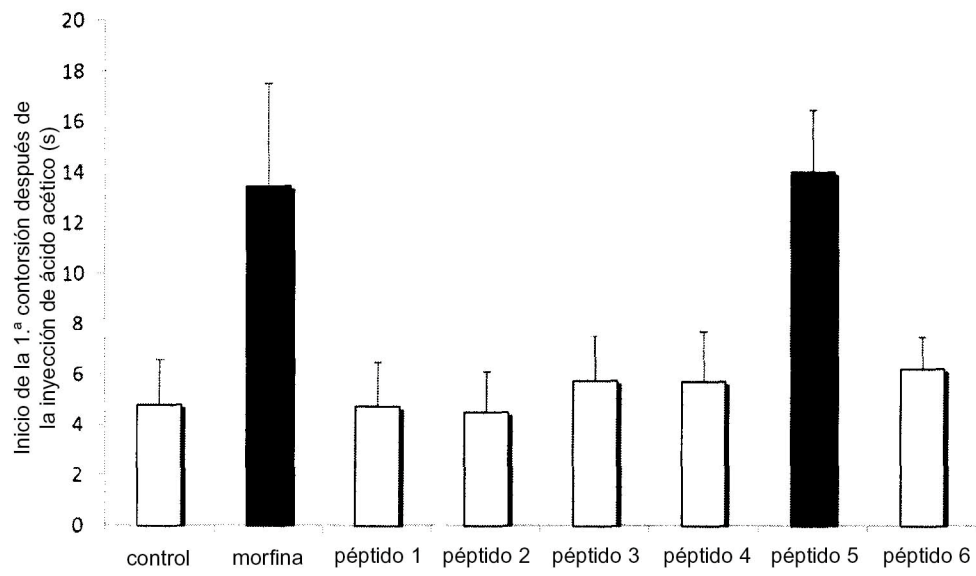


Fig. 3

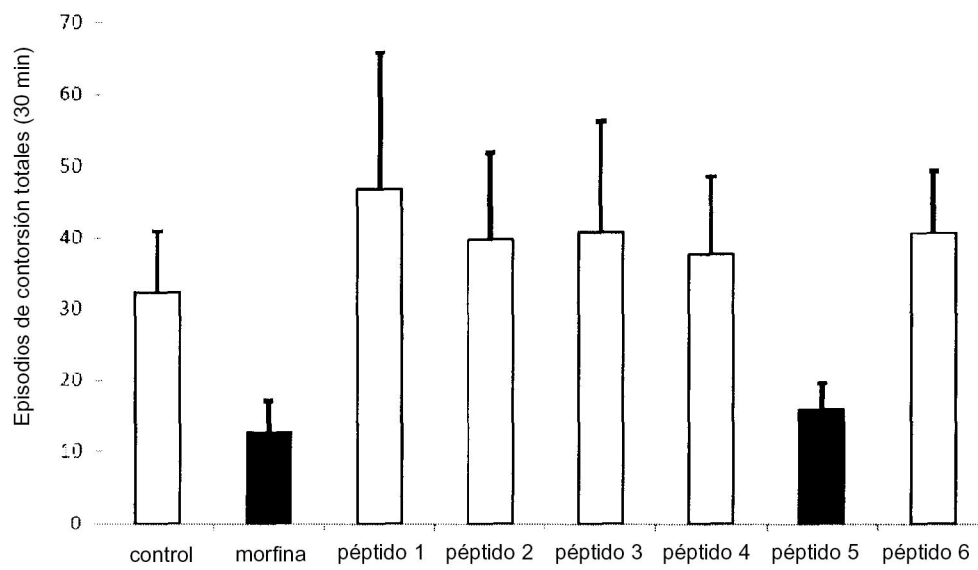


Fig.4

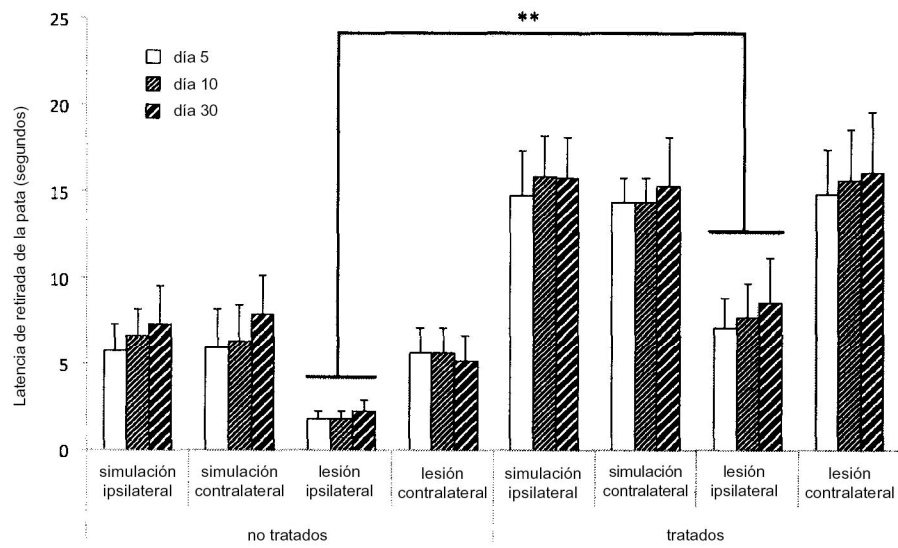


Fig. 5

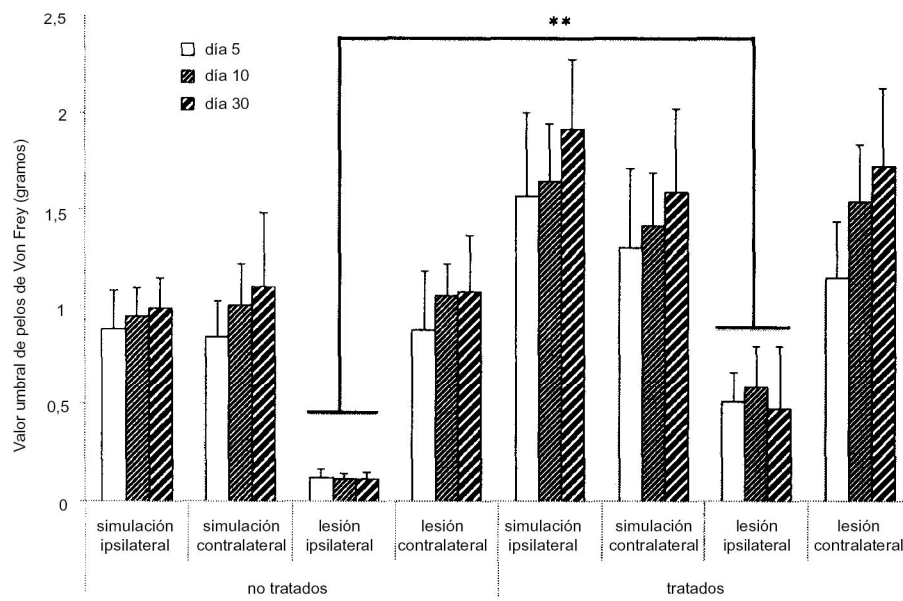


Fig. 6

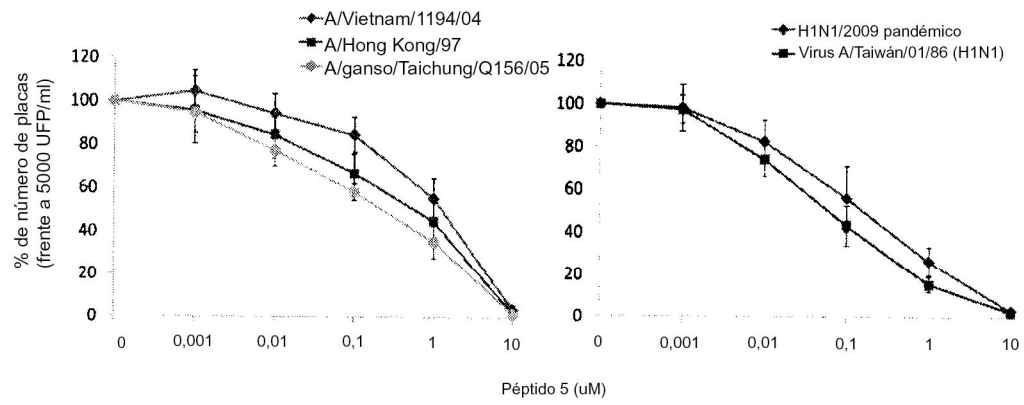


Fig. 7