

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 712 805**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.06.2012 PCT/US2012/042699**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174397**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.06.2012 E 12799815 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2720707**

54 Título: **Productos farmacéuticos antiinflamatorios**

30 Prioridad:

**15.06.2011 US 201161497270 P**  
**15.06.2012 US 201213524381**

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

**14.05.2019**

73 Titular/es:

**RESOTHER PHARMA APS "NÆSSESLOTTET"**  
**(100.0%)**  
**Dronninggårds Alle 136**  
**2840 Holte, DK**

72 Inventor/es:

**CONSALVO, ANGELO, P.;**  
**MEHTA, NOZER, M.;**  
**PERRETTI, MAURO y**  
**DALLI, JESMOND**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 712 805 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

Productos farmacéuticos antiinflamatorios

### 5 CAMPO

Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a compuestos antiinflamatorios que tienen una homología estructural definida con la anexina 1 humana, a composiciones farmacéuticas de los mismos, y a tratamientos médicos y usos de estos compuestos y composiciones como agentes antiinflamatorios.

10

### ANTECEDENTES

La superfamilia Anexina consiste en 13 proteínas de unión a fosfolípidos de calcio con una homología biológica y estructural significativa. Las anexinas se dividen estructuralmente en un dominio central altamente conservado y un dominio N-terminal variable. La anexina 1 (ANXA1, 37 kDa) es una proteína antiinflamatoria que inhibe la extravasación de leucocitos polimorfonucleares (PMN) transportados en sangre en el tejido circundante. La proteína se une al receptor FPR2 (o FPR-L1), donde inicia una cascada de eventos de señalización. Después de un estímulo inflamatorio, se produce la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) transportados en sangre en el tejido circundante. La transmigración o extravasación de PMN está regulada por mediadores tales como moléculas de adhesión, citocinas y proteasas, que controlan los procesos proinflamatorios y antiinflamatorios. El potencial disruptivo de los PMN es alto y potencialmente autodañino. Por lo tanto, el control de la extravasación de PMN y la respuesta inflamatoria es importante.

Para fines terapéuticos como agente antiinflamatorio, la proteína anexina 1 completa tiene numerosas desventajas con respecto a los fragmentos funcionales o versiones modificadas de los mismos. El gran tamaño de la proteína hace que sea más difícil de administrar mediante técnicas que son posibles con un polipéptido más pequeño (por ejemplo, por vía transdérmica o transmucosa). Para su uso en el tratamiento de la inflamación de los ojos, se espera que una molécula más pequeña penetre mejor en el epitelio corneal. Además, la susceptibilidad a la degradación proteolítica es una preocupación particular para todos los productos farmacéuticos peptídicos, en especial los grandes y especialmente si se contempla la administración oral (preferida por muchos pacientes).

Se ha demostrado que algunos derivados de anexina 1 que carecen de regiones significativas en el lado N-terminal del polipéptido carecen de actividad significativa en algunos ensayos de inflamación y liberación de mediadores, mientras que la N-acetil anexina 1 N-terminal de longitud completa (2-26) se consideró biológicamente activa en varios sistemas. Se ha demostrado que varios péptidos derivados principalmente de la porción N-terminal única de la proteína Anexina 1 poseen propiedades antiinflamatorias.

Uno de los péptidos de la anexina A1 estudiados más ampliamente es el péptido Ac2-26, que imita los aminoácidos 2 a 26 de la región N-terminal de 54 aminoácidos. Al igual que el fragmento Ac1-188 (y la proteína nativa), tiene una acetilación N-terminal para aumentar su estabilidad y, posiblemente, su semivida. Se ha demostrado que la anexina 1 y su péptido N-terminal (Ac2-26) ejercen la mayor parte de su acción antiinflamatoria a través del receptor FPR2/Lipoxina A4 (FPR2/Alx). *In vivo*, se ha demostrado que el péptido Ac2-26 ejerce un efecto antiinflamatorio en modelos de reperfusión de isquemia miocárdica (I/R), I/R del mesenterio, peritonitis por glucógeno y bolsa de aire de IL1, donde se informó que redujo significativamente el reclutamiento de neutrófilos al sitio de la lesión/inflamación. Las propiedades antiinflamatorias de este péptido no se limitan solo a los modelos agudos de inflamación. En un modelo de artritis, se demostró que la administración intraarticular del péptido Ac2-26 reduce la gravedad de la enfermedad a través de una reducción en el reclutamiento de neutrófilos.

Versiones más cortas del péptido Ac2-26, tales como los péptidos Ac2-12 y Ac2-6, también se ha demostrado que provocan cierto grado de efectos antiinflamatorios en modelos agudos de inflamación. El trabajo realizado por varios laboratorios ha demostrado que un péptido derivado de una región completamente independiente del extremo N-terminal de la proteína Anexina A1, más precisamente los aminoácidos 247-253 - en la tercera repetición de la región central de la proteína - denominada como antiinflamina-2 (AF2), también posee propiedades antiinflamatorias.

### 55 RESUMEN

Las realizaciones descritas en el presente documento se refieren a productos farmacéuticos antiinflamatorios, y más particularmente a polipéptidos, a composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos, y a métodos para tratar o prevenir la inflamación. Los productos farmacéuticos antiinflamatorios de la presente descripción tienen cualidades que incluyen, pero sin limitación, buena eficacia antiinflamatoria, estabilidad y/o facilidad de

administración, como se detalla en el presente documento.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:4.

5

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:5.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 6.

10

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:7.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:8.

15

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:9.

20

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 10.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO:11.

25

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 12.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 13.

30

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 14.

35

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 15.

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido como se expone en la SEQ ID NO: 16.

40

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene 47-50 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con los residuos 2-48 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 24 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1, y donde el residuo 24 del polipéptido no es valina. En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido tiene al menos un 94 por ciento de identidad con los residuos 2-48 de la SEQ ID NO: 1. En una realización de la presente divulgación, la región de homología del polipéptido es 100 % idéntica a los residuos 2-23 de la SEQ ID NO: 1.

45

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene 25-26 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que tiene al menos un 90 por ciento de identidad con los residuos 2-26 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 10 del polipéptido corresponde al residuo 11 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 10 del polipéptido es cualquier aminoácido excepto alanina, y donde el residuo 21 del péptido es cualquier aminoácido excepto valina.

50

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene 37-45 aminoácidos y que incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es 100 % idéntica a los residuos 12-24 de la SEQ ID NO: 1, y 100 % idéntica a los residuos 26-48 de la SEQ ID NO:1, donde cualquier residuo 14 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1 y no es valina, o donde el residuo 21 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1 y no es valina.

55

60

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene 47-50 aminoácidos y que incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es 100 % idéntica a los residuos 2-48 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido está amidado en su extremo C-terminal.

5

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene de 37 a 51 residuos de aminoácidos y que incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, donde la región de homología del polipéptido tiene al menos una de las siguientes características: (a) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 1 de la SEQ ID NO: 2 no es alanina, (b) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 12 de la SEQ ID NO: 2 no es valina, (c) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 15 de la SEQ ID NO: 2 no es valina, o (d) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 26 de la SEQ ID NO: 2 no es valina.

10

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene 47-48 aminoácidos y al menos un 90 % de identidad con los residuos 1-48 de la SEQ ID NO: 1.

15

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene de 47 a 51 residuos de aminoácidos y que incluye dentro de su estructura molecular una región de 47 residuos de aminoácidos que es un 100 % idéntica a los residuos 2-48 de la anexina 1 humana.

20

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene de 49 a 51 residuos de aminoácidos y que incluye dentro de su estructura molecular una región de 47 residuos de aminoácidos que es un 100 % idéntica a los residuos 2-48 de la anexina 1 humana.

25

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene al menos un 96 % de identidad con la SEQ ID NO: 11, donde el resto 10 no es alanina o el resto 21 no es valina. En algunas realizaciones de la presente divulgación, ni el residuo 10 es alanina ni tampoco el residuo 21 es valina.

30

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11, donde el resto 10 no es alanina o el resto 21 no es valina. En algunas realizaciones de la presente divulgación, ni el residuo 10 es alanina ni tampoco el residuo 21 es valina.

35

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, se proporciona un método para tratar o prevenir la inflamación que comprende administrar a un paciente que necesita dicho tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido antiinflamatorio de la presente divulgación.

40

De acuerdo con los aspectos descritos en el presente documento, un polipéptido de la presente divulgación se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de la inflamación. En una realización de la presente divulgación, el medicamento incluye uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

45

En una realización de la presente divulgación, una composición farmacéutica de la presente divulgación incluye, pero sin limitación, una composición en forma de comprimido o cápsula que comprende al menos un ácido farmacéuticamente aceptable, donde el ácido está presente en el comprimido o cápsula en una cantidad que, si el comprimido o la cápsula se añadieran a 10 mililitros de una solución acuosa 0,1 M de bicarbonato de sodio, sería suficiente para reducir el pH de la solución a no más de 5,5. Otras preferencias para las formas de dosificación se exponen a continuación.

50

Tanto el uso veterinario como humano se contemplan dentro del alcance de la presente descripción. Se espera que las dosis analizadas en el presente documento sean las mismas para uso humano y veterinario, excepto que se puede realizar un ajuste proporcional en función del peso relativo del animal al que se administrarán los productos farmacéuticos de la presente descripción.

## 55 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las realizaciones descritas actualmente se explicarán adicionalmente con referencia a los dibujos adjuntos, en los que las estructuras similares se mencionan con números similares en todas las diversas vistas. Los dibujos que se muestran no están necesariamente a escala, sino que se hace hincapié, generalmente, en ilustrar los principios de las realizaciones descritas actualmente.

60

- La Figura 1A** y **la Figura 1B** muestran el análisis de Western blotting que compara la potencia de activación de p-ERK a través del receptor FPR2 para cinco polipéptidos de la presente descripción en relación con Ac-ANAX1(2-26)-OH. **La Figura 1A** es una transferencia representativa para p-ERK y t-ERK. **La Figura 1B** muestra resultados de densitometría que relacionan p-ERK con los niveles de t-ERK.
- Las Figuras 2A-2C** son una serie de gráficos que informan datos del análisis de la cámara de flujo para determinar la capacidad inhibitoria de cinco polipéptidos de la presente descripción y Ac-ANAX1(2-26)-OH para reducir la interacción de PMN a una monocapa HUVEC activada. **La Figura 2A** muestra la cuantificación del grado de interacción PMN con las HUVEC como captura de PMN. **La Figura 2B** muestra la cuantificación del grado de interacción PMN con las HUVEC como adhesión de PMN. **La Figura 2C** muestra la cuantificación del grado de interacción PMN con las HUVEC como rodamiento.
- La Figura 3A** y **la Figura 3B** son una serie de gráficos de barras que comparan los efectos antiinflamatorios de tres polipéptidos de la presente descripción frente a un control solo de vehículo. **La Figura 3A** muestra el recuento celular y **la Figura 3B** muestra los efectos cuando se tuvieron en cuenta las células GR1 +ve.
- Las Figuras 4A-4C** son una serie de gráficos de barras que informan el porcentaje de inhibición proporcionado por tres polipéptidos de la presente descripción, a diferentes concentraciones, en tres parámetros diferentes (captura - **Figura 4A**; rodamiento - **FIG. 4B**; y adhesión - **Figura 4C**).
- La Figura 5** es una serie de gráficos de barras que informan la capacidad de tres polipéptidos de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para imitar una propiedad de la anexina A1 para inducir la fagocitosis de células apoptóticas.
- La Figura 6** es una serie de gráficos de barras que muestran la capacidad de un polipéptido de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para reducir el riesgo de lesión por reperfusión en relación con un control solo de vehículo.
- La Figura 7** es una serie de gráficos de barras que muestran la capacidad de dos polipéptidos de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para reducir el riesgo de lesión por reperfusión en relación con un control solo de vehículo.
- La Figura 8** es un gráfico logarítmico de la degradación a lo largo del tiempo de tres polipéptidos de la presente descripción, UGP022 (SEQ ID NO:5), UGP025 (SEQ ID NO:7) y UGP026 (SEQ ID NO:8) en presencia de PR3, una proteasa implicada en la escisión *in vivo* de la anexina 1.
- La Figura 9** es un gráfico logarítmico de la degradación a lo largo del tiempo de tres polipéptidos de la presente descripción, UGP022 (SEQ ID NO:5), UGP025 (SEQ ID NO:7) y UGP026 (SEQ ID NO:8) en presencia de HNE, una proteasa implicada en la escisión *in vivo* de la anexina 1.

### **DESCRIPCIÓN DETALLADA**

- La invención se define por las reivindicaciones adjuntas. Cualquier realización que no esté dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas no forma parte de la invención.
- En la lista de secuencias adjunta:
- La SEQ ID NO: 1 son los primeros 50 aminoácidos de la anexina 1 humana.
- La SEQ ID NO:2 son los aminoácidos 11-48 de la anexina 1 humana, modificados con variables que pueden ser cualquier aminoácido de origen natural en las posiciones 11, 22, 25 y 36 (con respecto a la anexina 1) que son equivalentes a las posiciones 1, 12, 15 y 26 de la SEQ ID NO:2.
- La SEQ ID NO:3 es casi idéntica a la SEQ ID NO:2, diferenciándose solamente en que la SEQ ID NO:3 omite el primer residuo de la SEQ ID NO:2.
- La SEQ ID NO:4 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP021. UGP021 tiene 50 aminoácidos de longitud. UGP021 es los aminoácidos 2-50 de la anexina 1 humana, donde la posición 50 del polipéptido es glicina. En una realización de la presente descripción, UGP021 se denomina ANXA1(2-50) Gly51-OH.
- La SEQ ID NO:5 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP022. UGP022 tiene 49 aminoácidos de longitud. UGP022 es los aminoácidos 2-50 de la anexina 1 humana, donde el polipéptido está amidado en su extremo C. En una realización de la presente descripción, UGP022 se denomina ANXA1(2-50)-NH<sub>2</sub>.
- La SEQ ID NO:6 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP024. UGP024 tiene 49 aminoácidos de longitud. UGP024 es los aminoácidos 2-50 de la anexina 1 humana. En una realización de la presente descripción, UGP024 se denomina ANXA1(2-50)-OH.
- SEQ ID NO:7 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP025. UGP025 tiene 47 aminoácidos de longitud. UGP025 es los aminoácidos 2-48 de la anexina 1 humana, donde el polipéptido está amidado en su extremo C, y donde el residuo 24 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 25 de SEQ ID NO:1 que es valina. En una realización de la presente descripción, UGP025 se denomina Leu25-ANXA1(2-48)-NH<sub>2</sub>.

La SEQ ID NO:8 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP026. UGP026 tiene 49 aminoácidos de longitud. UGP026 es los aminoácidos 2-50 de la anexina 1 humana, donde el polipéptido está amidado en su extremo C, y donde el residuo 24 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 25 de SEQ ID NO:1 que es valina. En una realización de la presente descripción, UGP026 se denomina Leu25-ANXA1(2-50)-NH<sub>2</sub>.

La SEQ ID NO:9 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP027. UGP027 tiene 44 aminoácidos de longitud. UGP027 es los aminoácidos 5-48 de la anexina 1 humana, donde el polipéptido está amidado en su extremo C, y donde el residuo 21 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 25 de SEQ ID NO:1 que es valina. En una realización de la presente descripción, UGP027 se denomina Leu25-ANXA1(5-48)-NH<sub>2</sub>.

La SEQ ID NO:10 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, UGP028. UGP028 tiene 37 aminoácidos de longitud. UGP028 es los aminoácidos 12-48 de la anexina 1 humana, donde el polipéptido está amidado en su extremo C, y donde el residuo 14 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 25 de SEQ ID NO:1 que es valina. En una realización de la presente descripción, UGP028 se denomina Leu25-ANXA1(12-48)-NH<sub>2</sub>.

La SEQ ID NO:11 es una realización de un polipéptido de la presente descripción. La SEQ ID NO: 11 tiene 25 aminoácidos de longitud. La SEQ ID NO: 11 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, modificados con variables que pueden ser cualquier aminoácido de origen natural en el residuo 10 y 21 del polipéptido (que son equivalentes a las posiciones 11 y 22 de SEQ ID NO:1).

La SEQ ID NO:12 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, Pep57. Pep57 tiene 25 aminoácidos de longitud. Pep57 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, donde el residuo 10 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 11 de SEQ ID NO:1 que es alanina, donde el residuo 21 del polipéptido es leucina en lugar del correspondiente residuo 22 de SEQ ID NO:1 que es valina, y donde el residuo 1 del polipéptido está acilado. En una realización de la presente descripción, Pep57 se denomina Leu11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH.

La SEQ ID NO:13 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, Pep59. Pep59 tiene 25 aminoácidos de longitud. Pep59 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, donde el residuo 10 del polipéptido es ácido aspártico en lugar del correspondiente residuo 11 de SEQ ID NO: 1 que es alanina, donde el residuo 21 del polipéptido es ácido aspártico en lugar del correspondiente residuo 22 de SEQ ID NO:1 que es valina, y donde el residuo 1 del polipéptido está acilado. En una realización de la presente descripción, Pep59 se denomina Asp11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH.

La SEQ ID NO:14 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, Pep84. Pep84 tiene 25 aminoácidos de longitud. Pep84 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, donde el residuo 10 del polipéptido es metionina en lugar del correspondiente residuo 11 de SEQ ID NO:1 que es alanina, donde el residuo 21 del polipéptido es metionina en lugar del correspondiente residuo 22 de SEQ ID NO:1 que es valina, y donde el residuo 1 del polipéptido está acilado. En una realización de la presente descripción, Pep84 se denomina Met11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH.

La SEQ ID NO:15 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, Pep60. Pep60 tiene 25 aminoácidos de longitud. Pep60 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, donde el residuo 10 del polipéptido es ácido glutámico en lugar del correspondiente residuo 11 de SEQ ID NO:1 que es alanina, donde el residuo 21 del polipéptido es ácido glutámico en lugar del correspondiente residuo 22 de SEQ ID NO:1 que es valina, y donde el residuo 1 del polipéptido está acilado. En una realización de la presente descripción, Pep60 se denomina Glu11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH.

La SEQ ID NO:16 es una realización de un polipéptido de la presente descripción, Pep83. Pep83 tiene 25 aminoácidos de longitud. Pep83 es los aminoácidos 2-26 de la anexina 1 humana, donde el residuo 10 del polipéptido es isoleucina en lugar del correspondiente residuo 11 de SEQ ID NO:1 que es alanina, donde el residuo 21 del polipéptido es isoleucina en lugar del correspondiente residuo 22 de SEQ ID NO:1 que es valina, y donde el residuo 1 del polipéptido está acilado. En una realización de la presente descripción, Pep83 se denomina Ile11,22-Ac-ANAX1(2-26)-OH.

Excepto cuando se indique otra cosa, o sea evidente a partir del contexto, las dosis en el presente documento se refieren al peso de los compuestos activos no afectados por excipientes, diluyentes, vehículos u otros ingredientes farmacéuticos, aunque dichos ingredientes adicionales se incluyen deseablemente, como se analiza con más detalle a continuación. Cualquier forma de dosificación (cápsula, comprimido, inyección o similares) comúnmente utilizada en la industria farmacéutica para la administración de agentes activos peptídicos es apropiada para su uso en el presente documento, y los términos "excipiente", "diluyente" o "vehículo" incluyen dichos principios no activos como se incluyen típicamente, junto con los principios activos en dicha forma de dosificación en la industria. Una forma de dosificación oral se analiza más detalladamente a continuación, pero no debe considerarse el modo exclusivo de administrar los agentes activos de la presente descripción. En algunas realizaciones de la presente descripción, puede utilizarse una mezcla de dos o más de los agentes activos polipeptídicos de la presente descripción en la

misma composición farmacéutica o forma de dosificación.

Como se usa en el presente documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero de aminoácidos y no se limita a una longitud específica de la molécula. El término incluye péptidos, oligopéptidos y proteínas. El término "polipéptido" también incluye modificaciones del polipéptido, por ejemplo, amidaciones, glucosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, ciclaciones y similares. Dentro de la definición se incluyen, por ejemplo, polipéptidos que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), polipéptidos con enlaces sustituidos, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, ambas de origen natural y sintéticas. El polipéptido puede producirse mediante cualquier síntesis de polipéptidos conocida en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, síntesis química o mediante técnicas de ADN recombinante.

Como se usa en el presente documento, el término "porcentaje de identidad" se refiere a la secuencia de aminoácidos sin tener en cuenta si un aminoácido dado está modificado con un sustituyente adicional (distinto de un aminoácido adicional). Por ejemplo, la cisteína se considera idéntica a la acetilcisteína para este fin. Asimismo, para este fin, una cisteína que ha formado un puente disulfuro con otra cisteína se consideraría idéntica a una cisteína que no ha formado tal puente. Como apreciarán los expertos en la técnica, los péptidos que tienen una pluralidad de residuos de cisteína frecuentemente forman un puente disulfuro entre dos de tales residuos de cisteína. Todos estos péptidos expuestos en el presente documento se definen como incluyendo opcionalmente uno o más de dichos puentes disulfuro. Como se usa en el presente documento, el término "Porcentaje de identidad" también contempla diferencias en el tamaño del péptido. Por ejemplo, un péptido de 34 residuos que por lo demás es idéntico a un péptido de 33 residuos (a excepción de su aminoácido adicional) se considera en el presente documento como un 97 % idéntico al péptido de 33 residuos.

Como se usa en el presente documento, la referencia a "inflamación" o "respuesta/enfermedad inflamatoria" se refiere a cualquier respuesta o enfermedad inflamatoria, que incluye, pero sin limitación, inflamación del ojo, gota, artritis gotosa, artritis reumatoide, asma, lesión o daño por reperusión, ictus, infarto de miocardio, choque séptico, o un trastorno inflamatorio de la piel, tal como psoriasis o eccema.

Cualquier preferencia indicada en el presente documento puede usarse en combinación con cualquier otra preferencia indicada en el presente documento, excepto cuando se desprenda de un contexto que podría producirse una inconsistencia.

Los solicitantes han descubierto algunas ventajas significativas en análogos más largos con homología sustancial con los residuos 2-48 o 2-50 de la anexina 1 humana, especialmente polipéptidos que tienen de 37-51 residuos e incluyen una región de homología sustancial con los residuos 11-48 de la anexina 1 humana, especialmente una región de homología sustancial con la SEQ ID NO: 2.

En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido de la presente descripción correspondiente con la SEQ ID NO:2 tiene al menos una (y en algunas realizaciones de la presente descripción, más) de las siguientes características: (a) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 1 de SEQ ID NO: 2 es arginina, (b) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 12 de SEQ ID NO: 2 es lisina, (c) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 es leucina, o (d) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 26 de SEQ ID NO: 2 es lisina. En una realización de la presente descripción, la región de homología es al menos un 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, y en algunas realizaciones de la presente descripción, un 100 % idéntica.

En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido correspondiente a la SEQ ID NO:2 difiere de la SEQ ID NO:2 en que el polipéptido correspondiente al residuo 15 de la SEQ ID NO:2 no es valina, y en algunas realizaciones de la presente descripción es leucina.

En una realización de la presente descripción, cuando un polipéptido de la presente descripción tiene 47-48 aminoácidos y al menos un 90 % de identidad con los residuos 1-48 de SEQ ID NO:1, el polipéptido tiene al menos una (y en algunas realizaciones de la presente descripción, más) de las siguientes características: (a) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 11 de SEQ ID NO:1 no es alanina (y en algunas realizaciones de la presente descripción es arginina), (b) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 22 de SEQ ID NO:1 no es valina (y en algunas realizaciones de la presente descripción es lisina), (c) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 25 de SEQ ID NO:1 no es valina (y en algunas realizaciones de la presente descripción es leucina), o (d) el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 36 de SEQ ID NO:1 no es valina (y en algunas realizaciones de la presente descripción es lisina).

Aunque los péptidos de la presente descripción pueden existir en forma de ácido libre, en algunos polipéptidos de la presente descripción, el aminoácido C-terminal está amidado. En una realización de la presente descripción, dicha amidación contribuye a la eficacia y/o biodisponibilidad del péptido. En una realización de la presente descripción, un polipéptido amidado C-terminal de la presente descripción, tal como la SEQ ID NO: 5, muestra mejores resultados *in vitro* que con un precursor de ácido libre, tal como la SEQ ID NO: 4. Sin la intención de quedar ligado a la teoría, es posible que dichos polipéptidos sean más estables porque el grupo amida confiere cierta resistencia a la acción de las carboxipeptidasas.

Los péptidos de la presente descripción se pueden acetilar en el extremo N, especialmente con respecto a los análogos de la Anexina 1 (2-26), tal como el polipéptido de la SEQ ID NO:11. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 de la SEQ ID NO:11 se seleccionan independientemente de ácido aspártico, lisina, metionina, leucina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 de la SEQ ID NO:11 se seleccionan independientemente de leucina, ácido aspártico, metionina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 de la SEQ ID NO:11 se seleccionan independientemente de leucina, ácido aspártico y metionina. En una realización de la presente descripción, los aminoácidos en las posiciones 10 y 21 de la SEQ ID NO: 11 son idénticos.

Como se describe en el presente documento, el péptido UGP021 de la presente descripción (SEQ ID NO: 4) y el péptido UGP024 de la presente descripción (SEQ ID NO: 6) se encuentra que son más potentes que Ac-ANXA1(2-26)-OH y ANXA1 de longitud completa. Estos péptidos, UGP021 y UGP024, han sido evaluados por su capacidad para inhibir las interacciones neutrófilo-endotelio usando un ensayo de cámara de flujo y se han ensayado *in vivo* utilizando un modelo de inflamación de bolsa de aire del ratón. Inesperadamente, se encontró que el péptido UGP022 de la presente descripción (SEQ ID NO: 5) (amida C-terminal) es más potente que el péptido UGP021 de la presente descripción (SEQ ID NO: 4) o el péptido UGP024 (SEQ ID NO: 6) de la presente descripción en estos ensayos.

En un intento por mejorar la potencia y aumentar la semivida del péptido UGP022 de la presente descripción (SEQ ID NO: 5), se realizó una serie de digestiones *in vitro* de PR3 y HNE. Los principales sitios de escisión para ambas serinas proteasas escindieron el péptido UGP022 de la presente descripción en Ala 10 (Ala11 con relación a la Anexina 1) y Val 21 (Val22 con relación a la Anexina 1), sin embargo, Val 35 (Val36 con relación a la Anexina 1) solo se escindió por HNE. Inesperadamente, ambas proteasas escindieron el péptido UGP022 de la presente descripción en Val 24 (Val25 en relación con la Anexina 1). Este sitio de escisión no se cree que haya sido identificado en la bibliografía.

Se prepararon dos análogos de Leu24 (Leu25 en relación con la anexina 1), el péptido UGP025 de la presente descripción (SEQ ID NO: 7) y el péptido UGP026 de la presente descripción (SEQ ID NO: 8). Se demostró que ambos péptidos, UGP025 y UGP026, eran más resistentes a PR3 y HNE que el péptido UGP022 de la presente descripción (SEQ ID NO: 5).

Las pruebas de degradación de tres polipéptidos de la presente descripción, UGP022 (SEQ ID NO:5), UGP025 (SEQ ID NO:7) y UGP026 (SEQ ID NO:8) en presencia de PR3, una proteasa implicada en la escisión *in vivo* de anexina 1, indicó una mejor estabilidad para los polipéptidos con sustitución de leucina en la posición 24 con respecto a un polipéptido que carece de esa característica. La posición 24 corresponde a la posición 25 de la anexina 1 porque todos los polipéptidos ensayados carecen de metionina en la posición 1 de la anexina natural. Un polipéptido de 47 residuos superó a un polipéptido de 49 residuos por lo demás idéntico. Se obtuvieron resultados similares en pruebas de degradación en presencia de HNE.

De las variantes peptídicas Ac2-26 probadas, se observó que tres péptidos de la presente descripción conducen a una señalización corriente abajo a través de la familia de receptores FPR, concretamente, el péptido Pep57 de la presente descripción, el péptido Pep59 de la presente descripción y el péptido Pep84 de la presente descripción. Se demostró que Pep57 y Pep84 inhibieron significativamente las interacciones PMN-HUVEC en el modelo de cámara de flujo con una actividad de hasta 10 pM. Cuando se probaron *in vivo*, en el modelo de bolsa de aire, ambos péptidos mostraron propiedades antiinflamatorias al inhibir significativamente la infiltración de leucocitos, inhibiendo Pep84 esta lectura inflamatoria en mayor medida.

Los experimentos cuyos resultados se indican en la **Figura 1A** y la **Figura 1B** se dirigió a determinar cuál de los cinco polipéptidos probados activó mejor p-ERK a través del receptor FPR2, similar a Ac-ANAX1(2-26)-OH, el péptido parental. Las células HEK-FPR2 se incubaron juntamente con 10  $\mu$ M de los nuevos péptidos Ac2-26 durante 8 minutos, después de lo cual las células se lisaron y se resuspendieron en una solución de lisis celular. Después, se cargaron 100 ng de proteína total en gel de poliacrilamida al 10%. Después de la electroforesis, la transferencia y el

bloqueo, la membrana se sondó primero con un anticuerpo anti p-ERK y luego se separó y resondó con un anticuerpo anti-ERK total. Mientras que la transferencia de t-ERK muestra cantidades iguales de ERK en todas las muestras, se observó que p-ERK activado era mayor con Pep57, 59 y 84, similar a la activación causada por el Ac2-26 precursor y menor que el segundo control, el péptido W. La **Figura 1A** es una transferencia representativa para p-ERK y t-ERK y la **Figura 1B** muestra resultados de densitometría que relacionan p-ERK con los niveles de t-ERK. Los datos presentados como media y SEM de 3 experimentos distintos con ANOVA unidireccional se emplearon para el análisis estadístico (\* = P <0,05 frente a CT).

Las **Figuras 2A-2C** son una serie de gráficos que informan datos del análisis de la cámara de flujo para determinar la capacidad inhibitoria de cinco polipéptidos de la presente descripción y Ac-ANAX1(2-26)-OH para reducir la interacción de PMN a una monocapa HUVEC activada. Los PMN ( $5 \times 10^6$ ) se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de los diversos péptidos durante 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Los PMN se hicieron fluir después durante 8 minutos a  $1 \text{ dina/cm}^2$ , antes de cuantificar el grado de interacción de PMN con las HUVEC, ambas como captura de PMN (**Figura 2A**), adhesión (**Figura 2B**) y rodamiento (**Figura 2C**). Los resultados resaltan el hecho de que solo Pep57, 60 y 84 muestran propiedades inhibitorias en este ensayo. Los datos son la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos independientes (con distintas preparaciones de PMN y HUVEC); \* = P <0,05 frente al grupo de CT, datos analizados utilizando ANOVA unidireccional. Pep57 y Pep84 mostraron propiedades inhibitorias similares a las observadas en el péptido Ac2-26 precursor, en línea con los datos de p-ERK. Pep59, que también mostró un potencial de activación de p-ERK muy alto, no mostró ninguna propiedad inhibitoria en este ensayo, mientras que, por otro lado, Pep60, que no fue tan eficaz para fosforilar ERK, mostró propiedades inhibitorias potentes similares a las mostradas por el péptido Ac2-26 precursor.

La **Figura 3A** y la **Figura 3B** son una serie de gráficos de barras que comparan los efectos antiinflamatorios de tres polipéptidos de la presente descripción frente a un control solo de vehículo. Los ratones recibieron  $200 \mu\text{l}$  i.v. de solución salina + DMSO o una dosis de  $50 \mu\text{g}$  por animal de uno de los tres péptidos derivados de Ac2-26, inmediatamente antes de la inyección local de IL- $1\beta$  de ratón en bolsas de aire de 6 días. La extensión de la migración celular se determinó 4 h más tarde, después del lavado de bolsas de aire y la tinción de las células migradas con el marcador Gr1. Cuando se contaron las células (**Figura 3A**), se observó que Pep57 y 84 mostraban propiedades antiinflamatorias, y Pep57 perdió este efecto observado cuando se tuvieron en cuenta las células GR1 +ve (**Figura 3B**). Los datos son la media  $\pm$  SEM de 5 ratones por grupo. \*P<0,05 frente al grupo de vehículo (ANOVA unidireccional). Pep57 y Pep84 mostraron potencial inhibitorio en el modelo. Pep84 era el más potente.

Las **Figuras 4A-4C** hacen una comparación directa de las actividades de UGP022, UGP025 y UGP026 en el ensayo de cámara de flujo, presentando el grado de inhibición en los tres parámetros bajo análisis (captura (**Figura 4A**); rodamiento (**Figura 4B**) y adhesión (**Figura 4C**)). Los tres péptidos UGP son capaces de reducir el número de PMN humanos que interactúan con un endotelio activado, actuando específicamente a través del receptor FPR2. Aunque UGP025 es menos activo en las concentraciones más altas probadas, parece ser ligeramente más activo en la concentración de  $100 \text{ fM}$  en comparación con el péptido UGP022.

En los últimos años, se han atribuido importantes propiedades de resolución de problemas a la Anexina A1, concretamente, la inducción de fagocitosis de células apoptóticas por macrófagos y células por igual. Este efecto también depende de FPR2 y se comparte con otros mediadores importantes a favor de la resolución, incluidas las lipoxinas y las resolvinas. Se realizaron experimentos para determinar si UGP022 y los derivados podrían imitar también este efecto de la Anexina A1, en vista de la potencia mostrada en una diversidad de ensayos biológicos.

La **Figura 5** es una serie de gráficos de barras que informan la capacidad de tres polipéptidos de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para imitar una propiedad de la anexina A1 para inducir la fagocitosis de células apoptóticas. Se puede observar en la **Figura 5** que los tres péptidos (UGP022, UGP025 y UGP026) promovieron la fagocitosis de la PMN apoptótica, mostrando UGP022 la mayor capacidad para inducir este proceso. Con respecto a algunos de los péptidos N-terminales más largos de la Anexina A1 (por ejemplo, 49 y 47 polipéptidos de residuos), cada uno de UGP021, UGP022 y UGP024 podría activar tanto FPR1 como FPR2, lo que conduce a la fosforilación de ERK y flujos de calcio intracelular. Se observó que tanto UGP021 como UGP022 poseían afinidad de unión al FPR2 en el rango nanomolar, mostrando UGP022 mostrando la afinidad más alta. También se observó que los tres péptidos poseen actividades antiinflamatorias en un ensayo *in vivo* de reclutamiento de leucocitos, siendo UGP022, de nuevo, los más potentes para inhibir el reclutamiento de leucocitos en la bolsa de aire inflamada.

El UGP022 ejerció propiedades antiinflamatorias en PMN humano con una significancia de hasta  $1 \text{ pM}$ . Se observó que FPR2 mediaba estos efectos de UGP022 en PMN humano. *In vivo*, UGP022 provocó potentes propiedades antiinflamatorias en la microcirculación inflamada con una potencia equivalente a la anexina A1 recombinante humana. Estos efectos fueron mediados por el ortólogo murino de FPR2. UGP022 presenta potentes propiedades

protectoras de tejido en un modelo de ratón de lesión miocárdica aguda.

UGP025 y UGP026 retienen una mayor afinidad por FPR2 sobre FPR1. UGP25 parece tener una mayor afinidad con FPR2 que UGP026. UGP025 y UGP026 poseen propiedades antiinflamatorias tanto *in vitro* como *in vivo* y, de nuevo, UGP025 parece ser más potente. Se descubrió una propiedad novedosa para estos péptidos, que es el efecto de resolución favorable sobre la eferocitosis (fagocitosis de células apoptóticas). Tal efecto de pro-resolución de UGP022, UGP025 y UGP026 se produce de una manera dependiente de Fpr2. En línea con el breve perfil biológico de UGP025 y UGP026, ambos péptidos pueden retener las propiedades protectoras tisulares de UGP022, lo que brinda protección cardíaca.

10

La **Figura 6** es una serie de gráficos de barras que muestran la capacidad de un polipéptido de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para reducir el riesgo de lesión por reperfusión en relación con un control solo de vehículo. Tamaño del infarto en ratones C57/Bl6 (~30 g de peso corporal) después de 25 minutos de isquemia (oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda; [LADCA]) y 120 minutos de reperfusión. Se administraron i.v. vehículo o UGP022 (más de 5 segundos en bolo) al comienzo de la reperfusión. El área en riesgo se midió después de la re-oclusión e inyección de colorante azul de Evans. El tamaño del infarto se determinó después de la tinción NBT del área en riesgo. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 4 ratones por grupo; \*\* P <0,01

La **Figura 7** es una serie de gráficos de barras que muestran la capacidad de dos polipéptidos de la presente descripción, a diferentes concentraciones, para reducir el riesgo de lesión por reperfusión en relación con un control solo de vehículo. Tamaño del infarto en ratones C57/Bl6 (~30 g de peso corporal) después de 25 minutos de isquemia (oclusión LADCA) y 120 minutos de reperfusión. Se administraron i.v. vehículo, UGP025 (5  $\mu$ g) o UGP026 (5  $\mu$ g) (más de 5 segundos en bolo) al comienzo de la reperfusión. El área en riesgo se midió después de la re-oclusión e inyección de colorante azul de Evans. El tamaño del infarto se determinó después de la tinción NBT del área en riesgo. Los resultados son la media  $\pm$  SEM de 4 ratones por grupo; \*\* P <0,01

La **Figura 8** es un gráfico logarítmico de la degradación a lo largo del tiempo de tres polipéptidos de la presente descripción, UGP022, UGP025 y UGP026 en presencia de PR3, una proteasa implicada en la escisión *in vivo* de la anexina 1. Se observó una mejor estabilidad para los polipéptidos con sustitución de leucina en la posición 24 (correspondiente a la posición 25 de la anexina 1 porque todos los polipéptidos ensayados carecen de metionina en la posición 1 de la anexina natural) en relación con un polipéptido que carece de esa característica. Además, un polipéptido de 47 residuos amidado en su extremo C superó a un polipéptido de 49 residuos por lo demás idéntico amidado en su extremo C.

La **Figura 9** es un gráfico logarítmico de la degradación a lo largo del tiempo de tres polipéptidos de la presente descripción, UGP022, UGP025 y UGP026 en presencia de HNE, una proteasa implicada en la escisión *in vivo* de la anexina 1. Se observó una mejor estabilidad para los polipéptidos con sustitución de leucina en la posición 24 (correspondiente a la posición 25 de la anexina 1 porque todos los polipéptidos ensayados carecen de metionina en la posición 1 de la anexina natural) en relación con un polipéptido que carece de esa característica. Además, un polipéptido de 47 residuos amidado en su extremo C superó a un polipéptido de 49 residuos por lo demás idéntico amidado en su extremo C.

Se cree que la producción recombinante de péptidos de la presente descripción es más rentable que otras técnicas conocidas en la técnica, aunque también se pueden usar estas otras técnicas. Preferiblemente, los péptidos de la presente descripción están amidados en su extremo C, aunque también se contemplan formas de ácido libre. Una técnica para fabricar versiones amidadas de los péptidos de la presente descripción es hacer reaccionar precursores (que tienen glicina en lugar del grupo amino C-terminal del producto amidado deseado) en presencia de monooxigenasa de alfa-amidación de peptidilglicina de acuerdo con técnicas conocidas donde los precursores se convierten en productos amidados en las reacciones descritas, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 4.708.934 y las Publicaciones de Patente Europea N.º 0 308 067 y 0 382 403. Se prefiere la producción recombinante tanto para el precursor como para la enzima que cataliza la conversión del precursor de la calcitonina de salmón. Dicha producción recombinante se analiza en Biotechnology, Vol. 11 (1993) págs. 64-70, que describe adicionalmente una conversión de un precursor en un producto amidado. La producción de productos amidados también se puede lograr utilizando el proceso y la enzima de amidación que se expone por Consalvo et al. en la Patente de Estados Unidos N.º 7.445.911; Miller et al. en la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2006/0292672; Ray et al, 2002, Protein Expression and Purification, 26:249-259 ("Ray"); y Mehta, 2004, Biopharm. International, July, págs. 44-46 ("Mehta").

La producción de los péptidos amidados de la presente descripción puede proceder, por ejemplo, produciendo un

precursor extendido de glicina en *E. coli* como una proteína de fusión soluble con glutatión-S-transferasa, o por expresión directa del precursor de acuerdo con la técnica descrita en la Patente de Estados Unidos N.º 6.103.495. Dicho precursor extendido de glicina tiene una estructura molecular que es idéntica al producto amidado deseado, excepto en el extremo C (donde el producto termina en -X-NH<sub>2</sub>, mientras que el precursor termina en -X-gly, siendo

- 5 X el residuo de aminoácido C-terminal del producto). Una enzima de alfa-amidación descrita en las publicaciones anteriores cataliza la conversión de precursores en producto. Esa enzima se produce de manera recombinante, por ejemplo, en células de ovario de hámster chino (CHO), como se describe en los artículos de *Biotechnology and Biopharm.* citados anteriormente.
- 10 Las formas de ácido libre de los agentes peptídicos activos de la presente descripción se pueden producir de manera similar, excepto sin incluir una glicina C-terminal en el "precursor", cuyo precursor es, en cambio, el producto peptídico final y no requiere la etapa de amidación.

La siguiente descripción proporciona una realización de un método de clonación y expresión de péptidos ANXA1 y

15 análogos de la presente descripción. Los péptidos ANXA1 y los análogos de la presente descripción se diseñaron para la clonación y expresión utilizando vectores para la expresión extracelular en *E. coli*. Los genes diseñados se sintetizaron por DNA 2.0 (Menlo Park, CA) utilizando su algoritmo de optimización de codones, seguido de modificaciones de aminoácidos individuales mediante PCR en las construcciones señaladas. El diseño del vector para estas construcciones se basó en el vector presentado en Ray, de modo que el gen de interés está codificado en

20 casetes dobles con cada casete compuesto por promotores duales y una secuencia de señal que precede al gen de interés, y secuencias de terminación de la transcripción dual después de gen de interés.

Gen	Origen	Modificación génica
ANXA1(2-50)-OH	DNA 2.0	NA
ANXA1(2-50)Gly51-OH	DNA 2.0	NA
ANXA1(2-48)Gly49-OH	DNA 2.0	codones aminoácidos optimizados de ANXA1(2-50)Gly51-OH
Leu25-ANXA1(2-48)Gly49	plantilla del gen ANXA1(2-50)	PCR, Val a Leu a 25 incorporado en el cebador de PCR
Leu25-ANXA1(2-50)Gly51-OH	plantilla del gen ANXA1(2-50)	PCR, Val a Leu a 25 incorporado en el cebador de PCR

La construcción de plásmido digénico de cada análogo se usó para transformar la cepa huésped de *E. coli* patentada

25 por los solicitantes, BLM6L, que tiene el Número de acceso PTA-5500, dando como resultado cepas de expresión para cada construcción de gen análogo. Estas líneas celulares recombinantes se cribaron para determinar la resistencia a la kanamicina y el crecimiento a 37 °C en un medio de inoculación semi-definido, como se describe en Ray; las construcciones de plásmidos se confirmaron con el mapeo de enzimas de restricción de diagnóstico, y los aislados finales se seleccionaron en experimentos en matraz de agitación para la producción extracelular del péptido

30 de interés, utilizando un ensayo de AEX-HPLC, descrito en otra parte. Los aislados seleccionados se evaluaron adicionalmente en fermentaciones a escala de banco. Cada fermentación se realizó como una realización en lote de alimentación limitado por el sustrato, con la inducción de la proteína recombinante obtenida utilizando el inductor químico, IPTG, que se incorporó a la alimentación. La fermentación se ejecutó en condiciones estándar de 32 °C, pH 6,6 y oxígeno disuelto al 80 % mediante la complementación con O<sub>2</sub> en medio como se describe en Ray. Estas

35 fermentaciones se analizaron y, en algunos casos, se recolectaron entre 23 y 31 horas después de la inducción. Para la purificación, se acidificó y enfrió la fermentación; el medio acondicionado se recogió mediante centrifugación para su procesamiento posterior.

Péptido ANXA1	Designación de línea celular	Título de fermentación (mg/l)*
ANXA1(2-50)-OH	UGL945	110
ANXA1(2-50)Gly51-OH	UGL946	202
ANXA1(2-48)Gly49-OH	UGL962	110
Leu25-ANXA1(2-48)Gly49-OH	UGL977	91
Leu25-ANXA1(2-50)Gly51-OH	UGL978	121

\* Los valores de productividad de la fermentación se determinaron mediante AEX-HPLC.

- 40 En una realización de la presente descripción, los péptidos recombinantes se purificaron a partir de 1 l de medio de fermentación acondicionado. Cada péptido se precipitó del medio acondicionado por acidificación a aproximadamente pH 2 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N. Los sedimentos se recogieron por centrifugación durante 1 hora a 10.000 rpm. Los sedimentos se resuspendieron en NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM a pH 7,8 durante una noche a 2-8 °C. Las

resuspensiones se centrifugaron durante 30 minutos a 10.000 rpm. El pH del sobrenadante se ajustó a 8,5 con NaOH 2 N. Cada sobrenadante de pH ajustado se cargó en una columna de intercambio de aniones Q-Sepharose Big Beads (GE Healthcare) (4,4 x 13,5 cm) equilibrada con TRIS 25 mM pH 8,5. La columna se operó a un caudal de 30 ml/min, y se controló la absorbancia UV del efluente de la columna a 280 nm. Los péptidos ANXA1 se eluyeron de la columna con TRIS 25 mM, NaCl 100 mM, pH 8,5. Las fracciones recogidas se seleccionaron mediante AEX-HPLC y RP-HPLC.

La  $\alpha$ -amidación C-terminal (si se requiere) se realizó utilizando monooxigenasa de alfa-amidación de peptidilglicina recombinante (rPAM). La  $\alpha$ -amidación de los péptidos ANXA1 extendidos con glicina se realizó a 0,5 mg/ml en presencia de TRIS 25 mM a pH 7,0 (JT Baker), CuSO<sub>4</sub> 0,5  $\mu$ M (JT Baker), etanol al 1 %, 125 U/ml de catalasa de *aspergillus niger* (Enzimas BBI), ascorbato 3 mM y 20.000 U/ml de rPAM. Las reacciones se incubaron a 37 °C durante 2-3 horas. Las reacciones se terminaron por congelación instantánea.

Los resultados de la  $\alpha$ -amidación se cargaron en una columna Amberchrom CG300 (Dow Chemical) RP (1,1 x 13,7 cm) equilibrada con TFA al 0,1 %, MeCN al 2 %. La columna se operó a un caudal de 2,85 ml/min, y se controló la absorbancia UV del efluente de la columna a 280 nm. La columna se sometió a un gradiente escalonado con TFA al 0,1 %, MeCN al 16 % y TFA al 0,1 %, MeCN al 24 % para eliminar las impurezas. Los péptidos ANXA1 se eluyeron de la columna con TFA al 0,1 %, MeCN al 40 %. Las fracciones recogidas se cribaron mediante AEX-HPLC y RP-HPLC.

Los péptidos ANAX1 se liofilizaron a sequedad utilizando una VirTis Freeze Mobile Consol 1.5 (Gardiner, NY) equipada con un controlador de vacío y un condensador externo de hielo seco/acetona. La pureza final de los péptidos ANXA1 fue >95 % evaluada por AEX/RP-HPLC.

La productividad de la pureza y la fermentación (título) de los péptidos ANAX1 se determinaron mediante AEX-HPLC. La cromatografía se realizó en una columna Hydrocell QA1500 (BioChrom Labs), 4,6 x 250 mm equilibrada con TRIS 10 mM, MeCN al 25 %, pH 8,0. La separación se logró utilizando un gradiente lineal del 0 % de A (TRIS 10 mM, MeCN al 25 % pH 8,0) al 20 % de B (TRIS 10 mM, NaCl 0,5 M, MeCN al 25 % pH 8,0) durante 20 minutos. La columna se operó a temperatura ambiente a un caudal de 1,2 ml/min. La absorbancia UV del efluente de la columna se controló a 220 nm. Los valores de productividad se determinaron basándose en la curva estándar para cada péptido.

La pureza de los péptidos ANAX1 se determinó mediante RP-HPLC. La cromatografía se realizó en una columna Thermo Electron BDS Hypersil C18 (Thermo Fisher Scientific), 4,6 x 250 mm, 5  $\mu$ m, 120 Å equilibrada con TFA al 0,1 %, MeCN al 18 %. La separación se logró utilizando un gradiente lineal del 20 % de A al 70 % de B (fase móvil A: 0,1 % de TFA; fase móvil B: 0,08 % de TFA, 90 % de MeCN) durante 20 minutos. La columna se operó a temperatura ambiente a un caudal de 1,2 ml/min. La absorbancia UV del efluente de la columna se controló a 220 nm.

Se estima que los péptidos de la presente descripción deben administrarse a una dosis adecuada para mantener los niveles séricos del péptido en pacientes entre 0,1 y 100 nanogramos por mililitro, preferiblemente entre 5 y 50 nanogramos por mililitro. Los niveles séricos pueden medirse mediante técnicas de radioinmunoensayo conocidas en la técnica. El médico tratante puede controlar la respuesta del paciente, y después puede alterar en cierta medida la dosis para dar cuenta del metabolismo y la respuesta del paciente individual.

Los compuestos usados en la presente descripción se preparan preferiblemente para su uso como productos farmacéuticos. Los polipéptidos pueden administrarse por cualquier vía adecuada comúnmente utilizada en la industria farmacéutica, incluyendo, pero sin limitación, la administración oral, parenteral, intramuscular, transdérmica o transmucosa. Las infusiones IV también pueden utilizarse en algunas realizaciones de la presente descripción. Las gotas oculares se pueden utilizar en tratamientos oculares. En algunas realizaciones de la presente descripción, los polipéptidos pueden administrarse junto con otros agentes antiinflamatorios.

Aunque se pueden usar otros métodos de administración, un péptido de la presente descripción puede formularse para administración oral, por ejemplo, como se expone en la Patente de Estados Unidos N.º 6.086.018, o la Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2009/0317462. Una forma de dosificación oral de acuerdo con la presente descripción se expone (a modo de ejemplo y no de limitación) en la Tabla 1 a continuación:

TABLA 1

COMPONENTES DE LA FORMULACIÓN DE DOSIFICACIÓN SÓLIDA	
AGENTE ACTIVO O EXCIPIENTE	FUNCIÓN
UGP025 (el polipéptido de SEQ ID NO:7)	Agente activo para la supresión de la inflamación
Partículas de ácido cítrico recubiertas con polímero de glucosa (maltodextrina)	Inhibidor de proteasa
Lauroilcarnitina	Potenciador de la absorción
Polímero no iónico	Subcapa
Eudragit L30D-55	Revestimiento entérico

Mientras que el péptido de la SEQ ID NO: 7 se proporciona como ejemplo, cualquier agente activo peptídico, analizado en el presente documento puede estar sustituido como agente activo. Una combinación de dos o más de estos agentes también puede estar sustituida.

Un comprimido de la presente descripción comprende un polipéptido de la presente descripción y al menos un ácido farmacéuticamente aceptable en el que el ácido está presente en el comprimido en una cantidad que, si el comprimido se añadiera a 10 mililitros de una solución acuosa 0,1 M de bicarbonato de sodio, sería suficiente para reducir el pH de la solución a no más de 5,5. Preferiblemente, el ácido comprende partículas de ácido que están recubiertas con un revestimiento protector farmacéuticamente aceptable que no es ácido y tiene una solubilidad en agua de al menos un gramo por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente. En algunas realizaciones de la presente descripción, la superficie exterior del comprimido es un vehículo protector resistente a los ácidos eficaz para transportar el comprimido a través del estómago de un paciente mientras se evita el contacto entre el polipéptido activo y las proteasas estomacales (por ejemplo, un recubrimiento entérico farmacéutico común). Se prefiere que dicho comprimido tenga una capa de barrera soluble en agua que separe el ácido revestido del vehículo protector. Donde esté presente, la capa de barrera soluble en agua (a) añade al menos un 3 % al peso de la composición farmacéutica, excluyendo cualquier vehículo protector de ácido, y/o (b) comprende un material que tiene una solubilidad en agua de más de 11 gramos por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente. Preferiblemente, el agente peptídico y el ácido están en la misma o única capa de la composición. La experiencia previa con la administración oral de péptidos de la técnica anterior sugiere que la administración oral como se describe en el presente documento podría proporcionar hasta un 1-5 por ciento de biodisponibilidad.

La administración puede ser por una dosis diaria única o por dosis múltiples. Independientemente del agente activo que se administre, se prefiere que se utilice una forma de dosificación única (por ejemplo, una sola cápsula o comprimido cuando se utiliza la administración oral) en cada administración porque una sola cápsula o comprimido proporciona mejor una liberación simultánea del agente activo peptídico, ácido (usado como inhibidor de proteasa) y potenciadores de la absorción. Esto es altamente deseable porque el ácido es capaz de reducir mejor el ataque proteolítico indeseable en el agente activo peptídico cuando el ácido se libera en un momento cercano a la liberación del agente activo.

La liberación casi simultánea se logra mejor administrando todos los componentes de la descripción como una sola píldora o cápsula. Sin embargo, la descripción también incluye, por ejemplo, dividir la cantidad requerida del principio activo entre dos o más comprimidos o cápsulas que pueden administrarse juntas de manera que juntas proporcionen la cantidad necesaria de todos los ingredientes. La "composición farmacéutica", como se usa en el presente documento, incluye, pero sin limitación, una dosis completa apropiada para una administración particular a un paciente, independientemente de si se recomiendan uno o más comprimidos o cápsulas (u otras formas de dosificación) en una administración determinada.

Los péptidos de acuerdo con la presente descripción también pueden administrarse mediante otras técnicas comunes en la industria con variaciones de dosificación normales entre modos de administración. Por ejemplo, es probable que un intervalo de dosis entre 1 y 100 microgramos al día (preferiblemente entre 5 y 50 microgramos al día) sea adecuado cuando se administra por inyección. Naturalmente, el médico tratante debe controlar la respuesta individual del paciente y ajustar la dosis en consecuencia.

En una composición farmacéutica para inyección, el agente activo peptídico de la presente descripción está presente preferiblemente en una concentración entre 10 microgramos/mililitro y 1000 microgramos por mililitro.

Las composiciones farmacéuticas de la presente descripción pueden incluir excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticos típicos, tales como agua, solución salina, glicerol, etanol, etc. Adicionalmente, o como alternativa, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes, sustancias tamponantes de pH, y similares,

pueden estar presentes en dichos vehículos. Otros ejemplos no limitantes de excipientes incluyen, pero sin limitación, excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como PBS 0,1 M (pH 7,4), NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M u otros fluidos farmacéuticamente aceptables. Las composiciones se pueden preparar como inyectables, como soluciones líquidas o suspensiones. También se pueden preparar formas sólidas adecuadas para solución o suspensión en vehículos líquidos antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse o encapsularse, por ejemplo, en liposomas.

Las composiciones utilizadas como productos farmacéuticos comprenden una cantidad eficaz del compuesto, así como cualquier otro de los componentes mencionados anteriormente, según sea necesario. Por "cantidad eficaz" se entiende que la administración de esa cantidad a un individuo ya sea en una dosis única o como parte de una serie, es eficaz para el tratamiento o la prevención de la inflamación. Esta cantidad varía dependiendo de la salud, la edad y la condición física del individuo a tratar, el grupo taxonómico del individuo a tratar (por ejemplo, primates no humanos, primates, etc.) y otros factores comunes que afectan la evaluación del médico tratante de los requisitos de dosificación.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene 47-50 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que tiene al menos un 90 % de identidad con los residuos 2-48 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 24 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1, y donde el residuo 24 del polipéptido no es valina.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene 25-26 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que tiene al menos un 90 % de identidad con los residuos 2-26 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 10 del polipéptido corresponde al residuo 11 de la SEQ ID NO: 1, donde el residuo 10 del polipéptido es cualquier aminoácido excepto alanina, y donde el residuo 21 del péptido es cualquier aminoácido excepto valina.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene 37-45 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es un 100 % idéntica a los residuos 12-24 de la SEQ ID NO: 1, y un 100 % idéntica a los residuos 26-48 de la SEQ ID NO:1, donde cualquier residuo 14 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1 y no es valina, o donde el residuo 21 del polipéptido corresponde al residuo 25 de la SEQ ID NO: 1 y no es valina.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene 47-50 aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es un 100 % idéntica a los residuos 2-48 de la SEQ ID NO: 1, donde el polipéptido está amidado en su extremo C-terminal.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente divulgación tiene de 37 a 51 residuos de aminoácido e incluye dentro de su estructura molecular una región de homología que es al menos un 90 % idéntica a la SEQ ID NO: 2, donde la región de homología del polipéptido tiene al menos una de las siguientes características: (a) el residuo 10 del polipéptido correspondiente al residuo 1 de SEQ ID NO: 2 no es alanina, (b) el residuo 21 del polipéptido correspondiente al residuo 12 de SEQ ID NO: 2 no es valina, (c) el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 no es valina o (d) el residuo 35 del polipéptido correspondiente al residuo 26 de SEQ ID NO: 2 no es valina. En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido tiene al menos dos de las siguientes características: (a) el residuo 10 del polipéptido correspondiente al residuo 1 de SEQ ID NO: 2 no es alanina, (b) el residuo 21 del polipéptido correspondiente al residuo 12 de SEQ ID NO: 2 no es valina, (c) el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 no es valina o (d) el residuo 35 del polipéptido correspondiente al residuo 26 de SEQ ID NO: 2 no es valina. En una realización, la región de homología del polipéptido tiene al menos tres de las siguientes características: (a) el residuo 10 del polipéptido correspondiente al residuo 1 de SEQ ID NO: 2 no es alanina, (b) el residuo 21 del polipéptido correspondiente al residuo 12 de SEQ ID NO: 2 no es valina, (c) el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 no es valina o (d) el residuo 35 del polipéptido correspondiente al residuo 26 de SEQ ID NO: 2 no es valina. En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido tiene cada una de las siguientes características: (a) el residuo 10 del polipéptido correspondiente al residuo 1 de SEQ ID NO: 2 no es alanina, (b) el residuo 21 del polipéptido correspondiente al residuo 12 de SEQ ID NO: 2 no es valina, (c) el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 no es valina y (d) el residuo 35 del polipéptido correspondiente al residuo 26 de SEQ ID NO: 2 no es valina. En una realización de la presente descripción, el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 no es valina. En una realización de la presente descripción, el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 15 de SEQ ID NO: 2 es leucina. En una realización de la presente descripción, la región de homología del polipéptido es al menos un 94 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En una realización de la presente descripción, la región de homología del

polipéptido es un 100 % idéntica a la SEQ ID NO: 2. En una realización de la presente descripción, el polipéptido está amidado en su extremo C.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene de 47 a 48 aminoácidos y tiene al menos un 90 % de identidad con los residuos 1-48 de SEQ ID NO: 1. En una realización de la presente descripción, el polipéptido tiene al menos una de las siguientes características: (a) el residuo 10 del polipéptido correspondiente al residuo 11 de SEQ ID NO: 1 no es alanina, (b) el residuo 21 del polipéptido correspondiente al residuo 22 de SEQ ID NO: 1 no es valina, (c) el residuo 24 del polipéptido correspondiente al residuo 25 de SEQ ID NO: 1 no es valina o (d) el residuo 35 del polipéptido correspondiente al residuo 36 de SEQ ID NO: 1 no es valina.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene al menos un 96 % de identidad con la SEQ ID NO: 11, donde el residuo 10 no es alanina y el residuo 21 no es valina. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente de ácido aspártico, lisina, metionina, leucina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente de leucina, ácido aspártico, metionina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente del grupo que consiste en leucina, ácido aspártico y metionina. En una realización de la presente descripción, el polipéptido tiene aminoácidos idénticos en las posiciones 10 y 21. En una realización de la presente descripción, el residuo 1 del polipéptido está acilado.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 11, donde el residuo 10 no es alanina y el residuo 21 no es valina. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente de ácido aspártico, lisina, metionina, leucina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente de leucina, ácido aspártico, metionina, isoleucina y ácido glutámico. En una realización de la presente descripción, los residuos 10 y 21 del polipéptido se seleccionan independientemente de leucina, ácido aspártico y metionina. En una realización de la presente descripción, el péptido tiene aminoácidos idénticos en las posiciones 10 y 21. En una realización de la presente descripción, el polipéptido está amidado en su extremo C.

En una realización de la presente descripción, un polipéptido de la presente descripción tiene de 47 a 51 residuos de aminoácidos e incluye dentro de su estructura molecular una región de 47 residuos de aminoácidos que es un 100 % idéntica a los residuos 2-48 de la anexina 1 humana. En una realización de la presente descripción, el polipéptido tiene de 49-51 residuos de aminoácidos. En una realización de la presente descripción, el polipéptido está amidado en su extremo C.

En una realización de la presente descripción, una composición farmacéutica de la presente descripción incluye un polipéptido de la presente descripción. En una realización de la presente descripción, la composición farmacéutica está en forma de un comprimido o cápsula. En una realización de la presente descripción, el comprimido o cápsula comprende al menos un ácido farmacéuticamente aceptable. En una realización de la presente descripción, el ácido está presente en el comprimido o cápsula en una cantidad que, si el comprimido o cápsula se añadieran a 10 mililitros de una solución acuosa 0,1 M de bicarbonato de sodio, sería suficiente para reducir el pH de la solución a no más de 5,5. En una realización de la presente descripción, el ácido comprende partículas de ácido que están recubiertas con un revestimiento protector farmacéuticamente aceptable. En una realización de la presente descripción, el revestimiento protector no es ácido. En una realización de la presente descripción, el revestimiento protector tiene una solubilidad en agua de al menos un gramo por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente. En una realización de la presente descripción, una superficie exterior de un comprimido o cápsula de la presente descripción es un vehículo protector resistente a los ácidos eficaz para transportar el comprimido o la cápsula a través del estómago de un paciente mientras se evita el contacto entre el polipéptido activo y las proteasas estomacales. En una realización de la presente descripción, un comprimido o cápsula de la presente descripción incluye una capa barrera soluble en agua que separa el ácido recubierto en el comprimido o cápsula del vehículo protector, donde la capa barrera soluble en agua (i) añade al menos un 3 % al peso de la composición farmacéutica, excluyendo cualquier vehículo protector de ácido, o (ii) comprende un material que tiene una solubilidad en agua superior a 11 gramos por 100 mililitros de agua a temperatura ambiente.

#### LISTA DE SECUENCIAS

<110> unigene Laboratories, Inc. Consalvo, Angelo P. Mehta, Nozer M. Perretti, Mauro Dalli, Jesmond

<120> Productos farmacéuticos antiinflamatorios

<130> 133302-465122

5 <140> Aún no asignado

<141> 15-06-2012

<150> 13/524.381

<151> 15-06-2012

10

<150> 61/497.270

<151> 15-06-2011

<160> 16

15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 50

20 <212> PRT

<213> Ser humano

<400> 1

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

Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro  
20 25 30

Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val  
35 40 45

Ala Ala  
50

25

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>

35 <221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

<220>

40 <221> MISC\_FEATURE

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
 <222> (15)..(15)  
 <223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

5 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (26)..(26)  
 <223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

10 <400> 2  
 Xaa Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Xaa Lys  
 1 5 10 15  
 Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Xaa Ser Pro Tyr Pro Thr Phe  
 20 25 30  
 Asn Pro Ser Ser Asp Val  
 35

<210> 3  
 <211> 37

15 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

20 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (11)..(11)  
 <223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

25 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (14)..(14)  
 <223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

30 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (25)..(25)  
 <223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

35 <400> 3  
 Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Xaa Lys Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Xaa Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn  
 20 25 30  
 Pro Ser Ser Asp Val

35

40 <210> 4

ES 2 712 805 T3

<211> 50  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<400> 4

```
Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
 1          5          10          15
Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
          20          25
Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
          35          40          45
Ala Gly
 50
```

10 <210> 5  
<211> 49  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>  
20 <221> MOD\_RES  
<222> (49)..(49)  
<223> AMIDACIÓN

<400> 5

```
Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu
 1          5          10          15
Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly
          20          25
Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala
          35          40          45
```

25 Ala

<210> 6  
<211> 49  
<212> PRT  
30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

35 <400> 6

ES 2 712 805 T3

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

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Val Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly  
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala  
35 40 45

Ala

<210> 7

<211> 47

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (47)..(47)

<223> AMIDACIÓN

15

<400> 7

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

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly  
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val  
35 40 45

<210> 8

20 <211> 49

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (49)..(49)

30 <223> AMIDACIÓN

<400> 8

ES 2 712 805 T3

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

Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly  
20 25 30

Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val Ala  
35 40 45

Ala

<210> 9

<211> 44

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44)..(44)

<223> AMIDACIÓN

15

<400> 9

Ser Glu Phe Leu Lys Gln Ala Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu  
1 5 10 15

Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val  
20 25 30

Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn Pro Ser Ser Asp Val  
35 40

<210> 10

20 <211> 37

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (37)..(37)

30 <223> AMIDACIÓN

<400> 10

ES 2 712 805 T3

Trp Phe Ile Glu Asn Glu Glu Gln Glu Tyr Val Gln Thr Leu Lys Ser  
 1 5 10 15

Ser Lys Gly Gly Pro Gly Ser Ala Val Ser Pro Tyr Pro Thr Phe Asn  
 20 25 30

Pro Ser Ser Asp Val  
 35

<210> 11

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10)..(10)

<223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

15

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (21) .. (21)

<223> Xaa puede ser un aminoácido de origen natural

20

<400> 11

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Xaa Trp Phe Ile Glu Asn Glu  
 1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Xaa Gln Thr Val Lys  
 20 25

<210> 12

25 <211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

35 <223> ACETILACIÓN

<400> 12

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

Glu Gln Glu Tyr Leu Gln Thr Val Lys  
 20 25

40

<210> 13

<211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>  
 <221> MOD\_RES

10 <222> (1).. (1)  
 <223> ACETILACIÓN

<400> 13

Ala Met Val Ser Glu Phe Leu Lys Gln Asp Trp Phe Ile Glu Asn Glu  
 1 5 10 15

Glu Gln Glu Tyr Asp Gln Thr Val Lys  
 20 25

15

<210> 14  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20

<220>  
 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>  
 <221> MOD\_RES

25 <222> (1).. (1)  
 <223> ACETILACIÓN

<400> 14

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

Glu Gln Glu Tyr Met Gln Thr Val Lys  
 20 25

30

<210> 15  
 <211> 25  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35

<220>  
 <223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

<220>  
 <221> MOD\_RES

40 <222> (1).. (1)  
 <223> ACETILACIÓN

45 <400> 15

ES 2 712 805 T3

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

Glu Gln Glu Tyr Glu Gln Thr Val Lys  
20 25

<210> 16

<211> 25

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia sintética que tiene parte de homología con la anexina 1 humana

10

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1).. (1)

<223> ACETILACIÓN

15

<400> 16

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

Glu Gln Glu Tyr Ile Gln Thr Val Lys  
20 25

**REIVINDICACIONES**

1. Un polipéptido que consiste en 47-50 aminoácidos, donde una región de 47 aminoácidos consecutivos tiene al menos un 90 % de identidad con los residuos 2-48 de SEQ ID NO: 1, donde el residuo del polipéptido correspondiente al residuo 25 de SEQ ID NO:1 no es valina.
2. El polipéptido de la reivindicación 1, donde dicho residuo es leucina.
3. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el polipéptido está amidado en su extremo C.
4. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el polipéptido se selecciona de una de la SEQ ID NO: 7, o la SEQ ID NO: 8.
5. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el residuo 1 está acetilado.
6. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende además metionina situada antes del residuo 1.
7. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. El polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en un método para tratar o prevenir la inflamación que comprende administrar a un paciente que necesita tal tratamiento o prevención una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido.

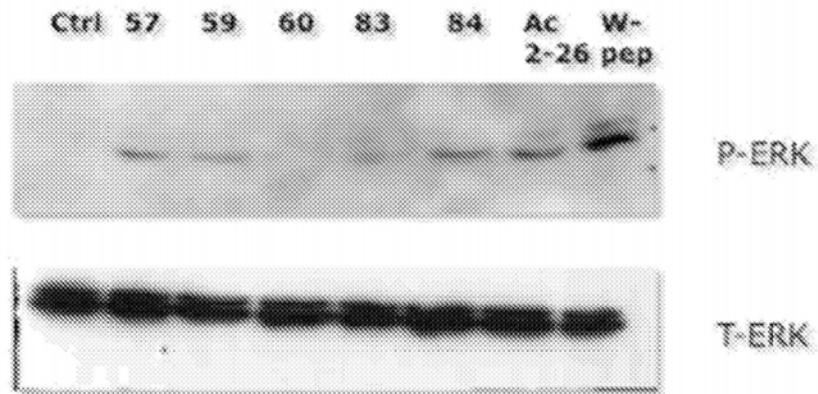


FIG. 1A

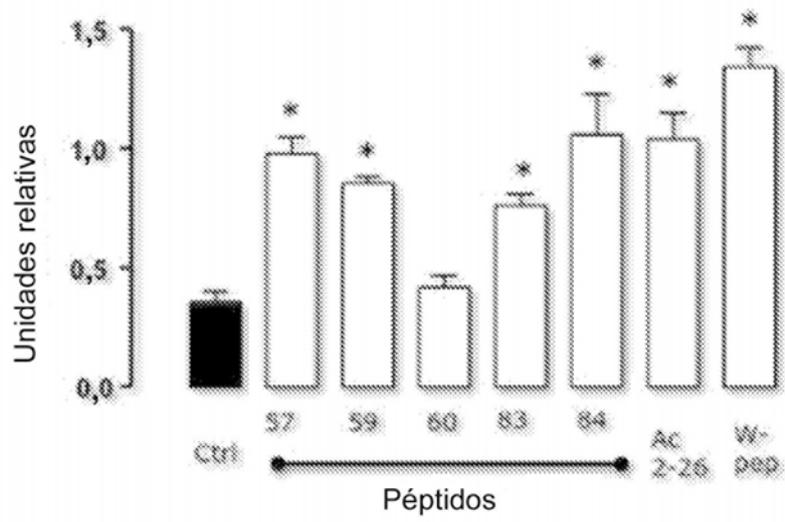
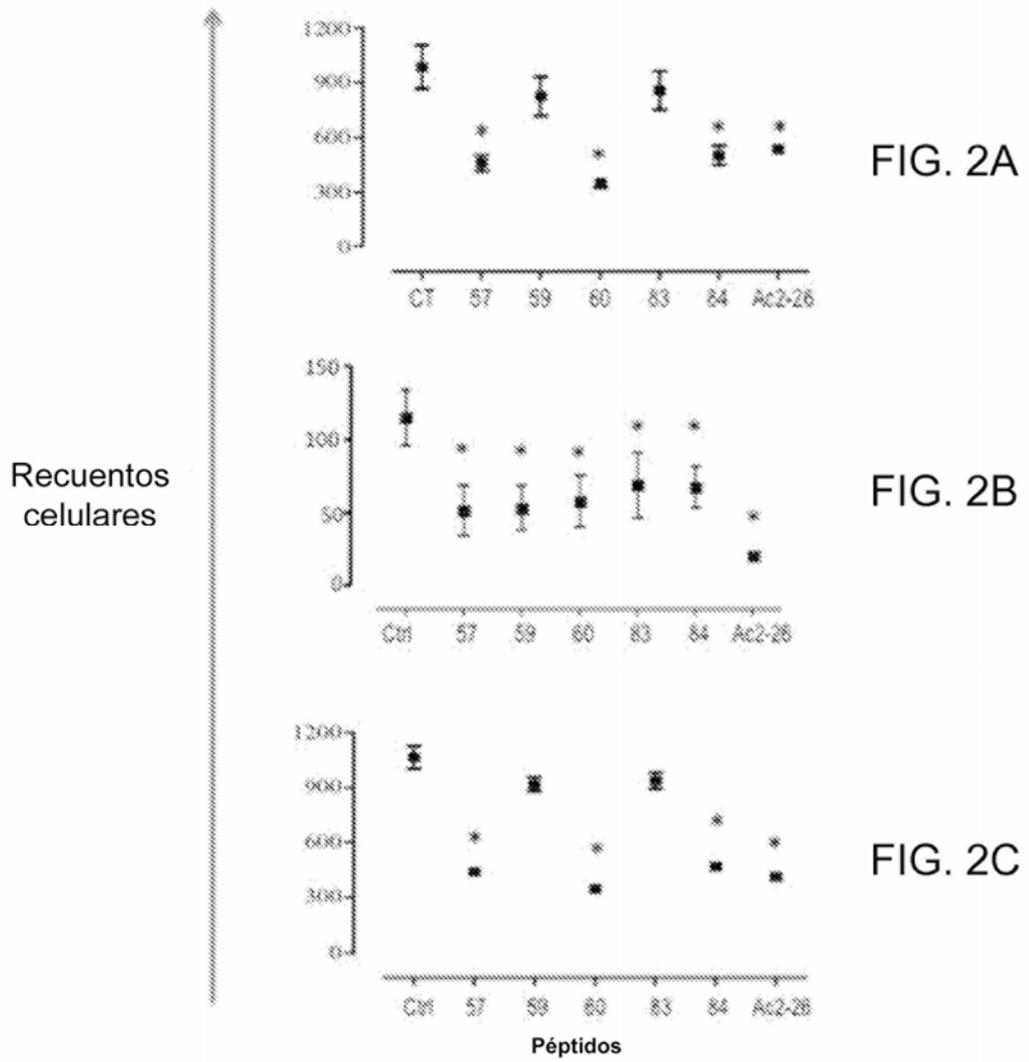


FIG. 1B



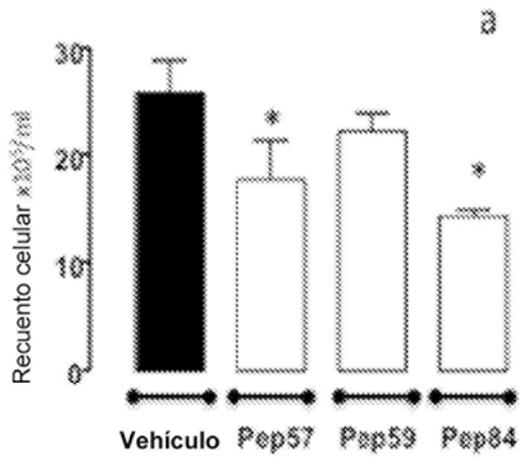


FIG. 3A

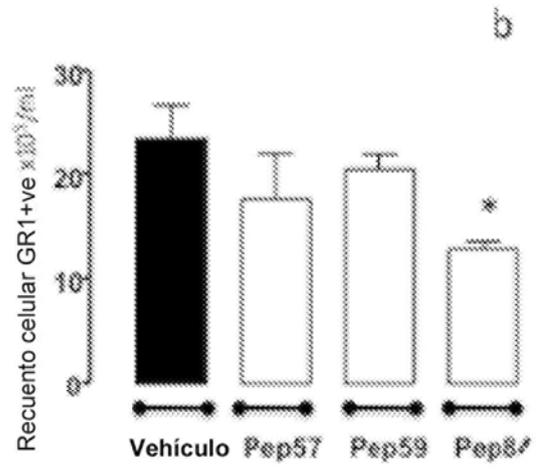


FIG. 3B

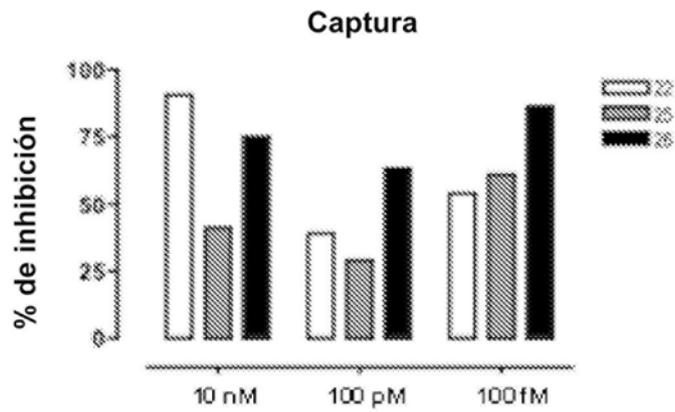


FIG. 4A

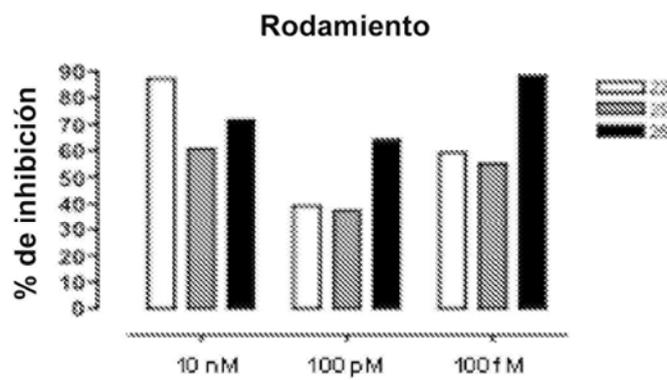


FIG. 4B

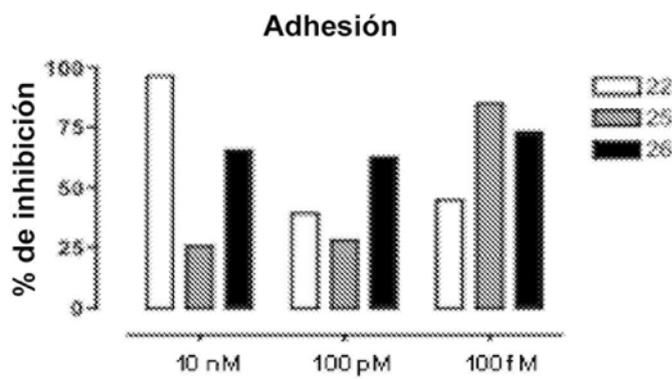


FIG. 4C

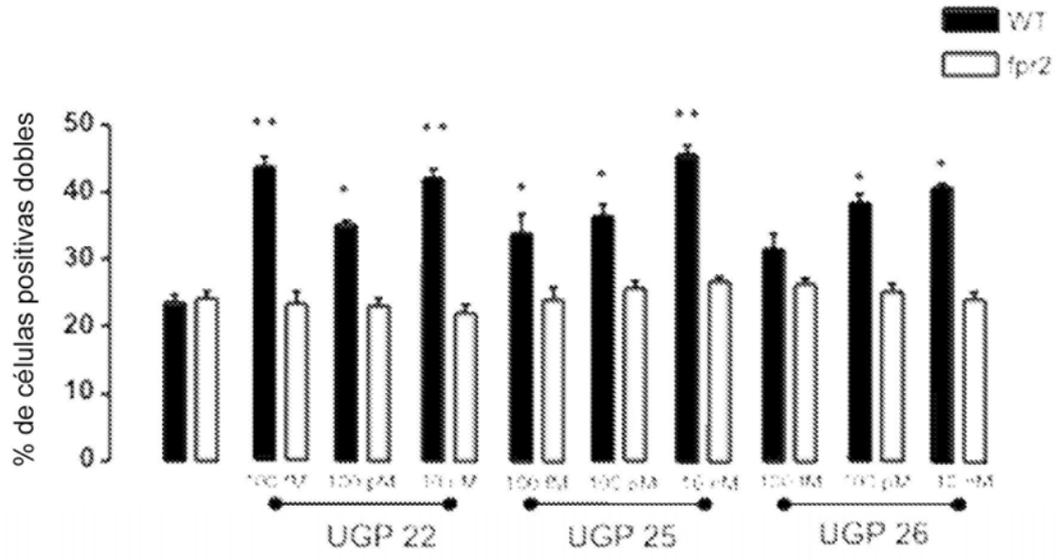


FIG. 5

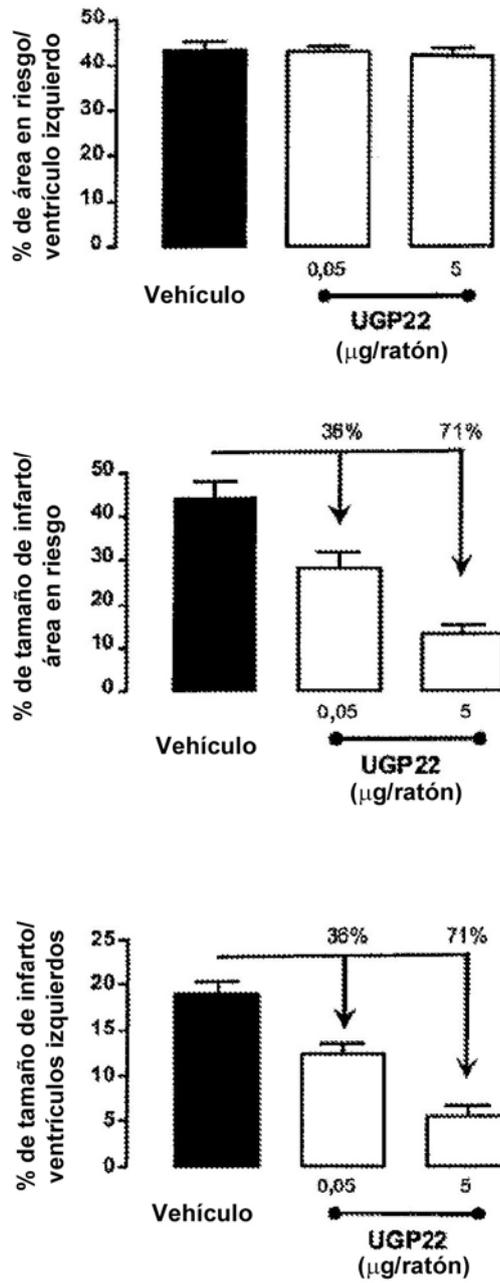


FIG. 6

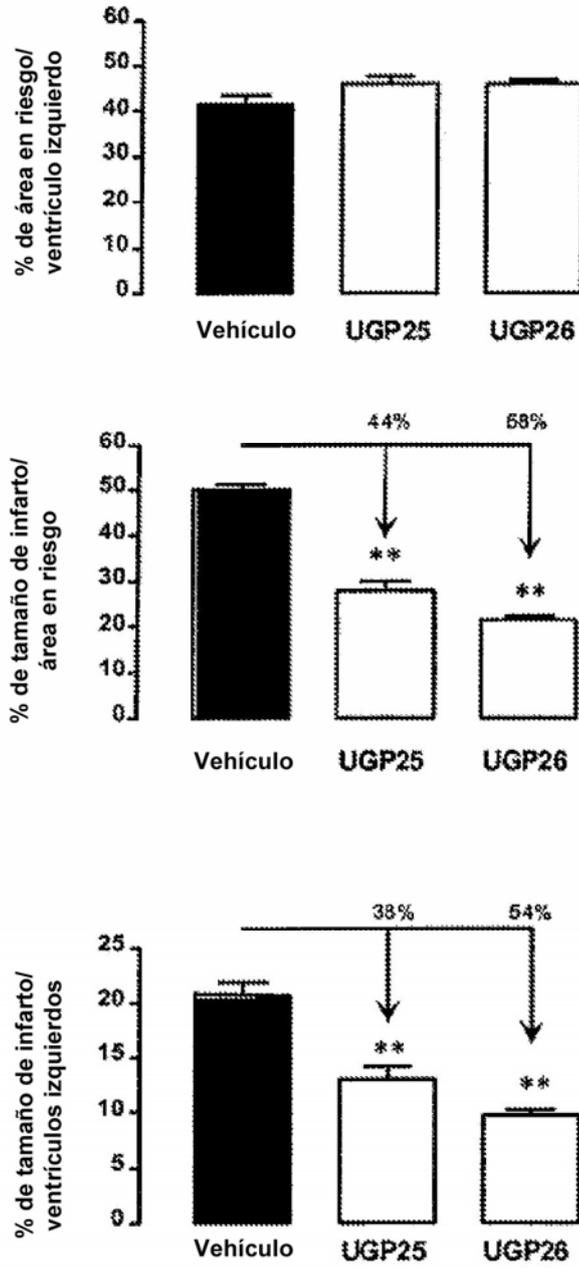


FIG. 7

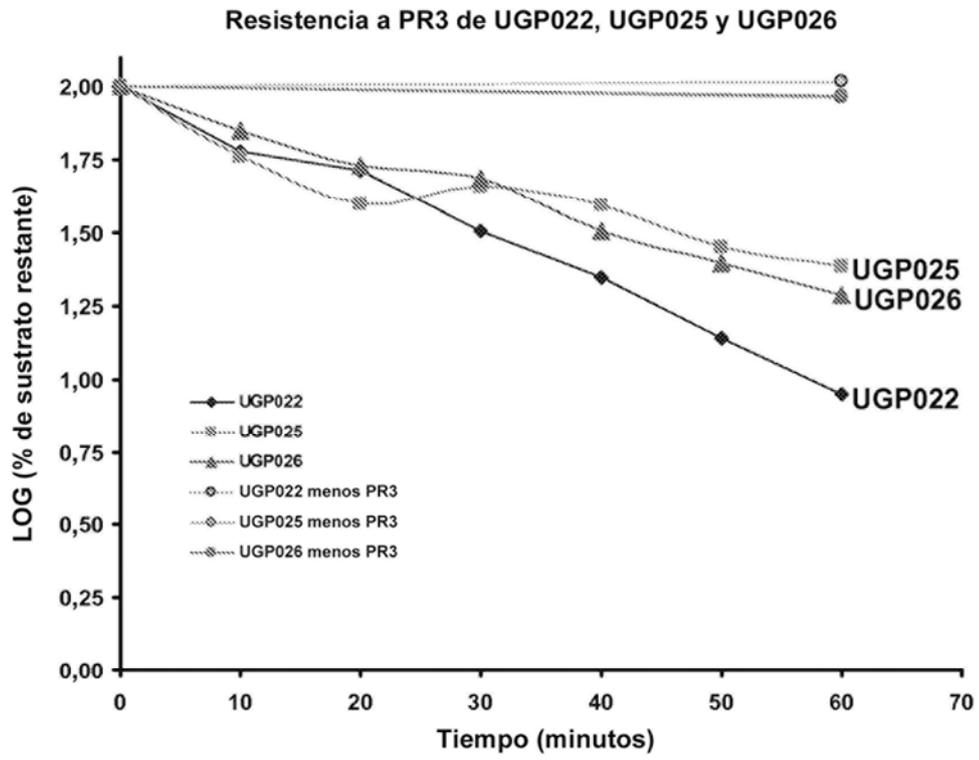


FIG. 8

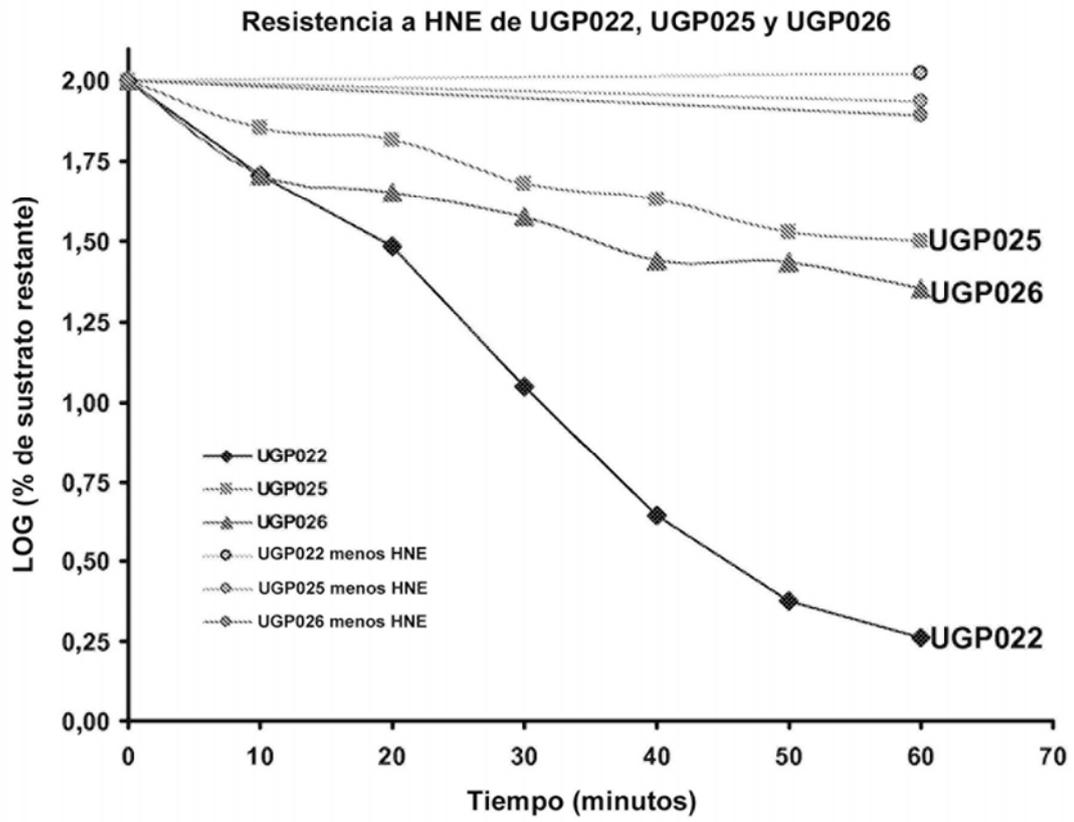


FIG. 9