



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 272 811**

51 Int. Cl.:  
**A61K 38/08** (2006.01)  
**A61K 38/22** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02800641 .9**  
86 Fecha de presentación : **08.10.2002**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1450843**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **01.09.2004**

54 Título: **Uso de péptidos análogos de la timulina (PAT) para la fabricación de medicamentos contra el dolor.**

30 Prioridad: **09.10.2001 FR 01 12984**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2007**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2007**

73 Titular/es: **INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET  
DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM)  
101, rue de Tolbiac  
75654 Paris Cédex 13, FR  
Centre National de la Recherche Scientifique  
Nayef Saade y  
Bared Safieh-Garabedian**

72 Inventor/es: **Dardenne, Mireille;  
Pleau, Jean-Marie;  
Bach, Jean-François;  
Saade, Nayef y  
Safieh-Garabedian, Bared**

74 Agente: **Ruo, Alessandro**

ES 2 272 811 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).

# ES 2 272 811 T3

## DESCRIPCIÓN

Uso de péptidos análogos de la timulina (PAT) para la fabricación de medicamentos contra el dolor.

5 La invención se refiere al uso de péptidos análogos de la timulina para la fabricación de medicamentos contra el dolor.

La mayoría de los dolores agudos o crónicos son resultado de una reacción inflamatoria. Los tratamientos preconizados para disminuir el dolor consisten a menudo en reducir en primer lugar la reacción inflamatoria.

10 Actualmente existen dos clases principales de medicamentos antiinflamatorios:

- los antiinflamatorios no esteroideos (AINE),
- 15 - los corticosteroides.

Los AINE y los corticosteroides presentan el inconveniente de asociar a su efecto terapéutico beneficioso (disminución de la inflamación y del dolor) un efecto secundario molesto.

20 De hecho, los AINE provocan la formación de úlceras mientras que los corticosteroides tienen una acción inmunosupresora.

El medicamento analgésico antiinflamatorio ideal sería así un medicamento que no presente efecto secundario, ni en las funciones fisiológicas, ni en el sistema inmunitario.

25 Además, existe un segundo tipo de dolor que no tiene como origen la inflamación. Estos dolores neurógenos se caracterizan, entre otros, por su resistencia a los tratamientos tradicionales, comprendidos los opiáceos. Se han planteado diferentes tratamientos como el uso de antiinflamatorios, antiepilépticos, antidepresivos, fármacos simpatolíticos o combinaciones de los mismos.

30 Sin embargo, los dolores neurógenos son muy variados y, así, muy difícilmente tratables.

De estas consideraciones se concluye que los medicamentos hoy disponibles para curar el dolor son de número limitado y demuestran ser a veces ineficaces. Esta ineficacia puede tener además como resultado una habituación al producto. El profesional se encuentra entonces obligado a modificar su prescripción. Para que ésta demuestre ser eficaz, debe poder disponer de otra clase de medicamentos.

Esto explica la importancia de la investigación en este campo.

40 Se han descrito ya péptidos análogos de la timulina de la presente invención en las patentes y certificado de adición FR-7.715.963, FR-7.811.870 y EP-0.041.019 como medicamentos para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, la estimulación de células T y la prevención de rechazo de injertos. Las propiedades de estos péptidos en el sistema inmunitario demuestran ser dependientes del cinc. De hecho, el cinc contenido en el péptido le da una conformación tetraédrica que corresponde a la forma activa de la molécula. En ausencia de cinc, los péptidos análogos no poseían ya ninguna actividad. Además, a continuación se demuestra que estas propiedades, puestas de relieve por ensayos *in vitro*, no han tenido ningún efecto en el sistema inmunitario durante ensayos *in vivo*. Además, no han provocado efectos secundarios. Estos péptidos presentan una inocuidad perfecta.

50 Numerosas publicaciones han demostrado que la timulina podía, según la dosis inyectada, provocar o reducir una hiperalgesia (Safieh-Garabedian y col., Neuroimmunomodulation, 6:39-44, 1999). Para una dosis débil (del orden del nanogramo por rata, es decir, 0,2 a 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), la timulina induce la hiperalgesia, mientras que a dosis más importantes (del orden del microgramo por rata, es decir, 50-100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), la reduce. El uso de la timulina era así imposible, dado su efecto en el sistema inmunitario y este efecto dependiente de la dosis (o bifásico), que provoca el dolor o lo disminuye.

55 Los autores de la invención se han interesado entonces por los péptidos análogos de la timulina inactivos con respecto al sistema inmunitario. Aunque éstos no hayan presentado la actividad primera prevista, han verificado su espectro de actividad y constatado que, contra lo que se esperaba, no presentaban este efecto ambivalente dependiente de la dosis, que poseían únicamente una actividad analgésica, sin ser dependientes del cinc, y que finalmente, demostraban ser activos *in vivo*.

60 Los trabajos de los autores de la invención les han llevado así a elaborar, a partir de estos péptidos cuya inocuidad ha sido ya establecida además, una nueva clase de medicamentos antidolor que permiten tratar los dolores de origen inflamatorio y/o los dolores neurógenos.

65 La presente invención se refiere al uso de péptidos análogos de la timulina (PAT) inactivos con respecto al sistema inmunitario que no contienen cinc y que presentan una actividad antidolor para fabricar un medicamento destinado al tratamiento del dolor.

## ES 2 272 811 T3

Por “péptidos análogos de la timulina inactivos con respecto al sistema inmunitario” se entiende los péptidos análogos de la timulina inactivos con respecto a las respuestas inmunitarias específicas de los linfocitos T. En particular, estos péptidos no forman complejos con metales como, por ejemplo, el cinc (Dardenne y col., *PNAS*, **79**:5370-5373, 1982).

5

El uso de péptidos según la invención presenta la ventaja de ser eficaz contra el dolor sin inducir efectos secundarios molestos.

Estos péptidos son además eficaces a dosis de 10 a 100 veces inferiores a las de los analgésicos clásicos; por ejemplo, en la rata, las dosis usadas son del orden de 1  $\mu\text{g}$  por rata (es decir, 5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) frente a 4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para los fármacos antiinflamatorios no esteroideos y 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  para los fármacos antiinflamatorios esteroideos. Se ha constatado igualmente una actividad para dosis inferiores, del orden de 50 a 200  $\text{ng}/\text{rata}$ , es decir, de 0,25 a 1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

En particular, los péptidos usados según la invención presentan la secuencia siguiente:

15

X-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn

en la que X representa Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Glu-Ala-Lys-Ser, Gln-Ala-Lys-Ser, PyroGlu-Ala-Lys-Ser, así como toda secuencia derivada que comporte 1 ó 2 aminoácidos modificados, siendo las modificaciones posibles de la naturaleza siguiente:

20

PyroGlu: D-PyroGlu, Glu, Gln

Gln: Z-Gln, D-Gln, Pro, Cys (S-CONH<sub>2</sub>), Met(O), Glu, Glu ( $\gamma$ -ciano), Glu ( $\gamma$ CS-NH<sub>2</sub>), D-Glu, Asn, NorVal

25

Ala: D-Ala, Z-Ala, Ac-Ala

Lys: Arg, D-Lys, N- $\gamma$ -Z-Lys, Lys(N<sup>6</sup>-acetil), Orn, Har, 2-amino-hexanoílo, 2,6-diamino-hexinoílo, 2,6-diamino-hexenoílo, Hep, D-Lys(N<sup>6</sup>-acetil)

30

Ser: Ala, (N-metil)Ser, D-Ser, Thr

Gly: Ala, Ser, D-Ala, D-Leu

35

Asn: CianoAla, Thio-Asn, Asp, Gln, Glu,  $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>, D-Asn, Asn-NH<sub>2</sub>

La referencia a los “análogos de la timulina” excluye claramente la timulina, péptido que presenta la secuencia siguiente: PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn.

40

La invención se dirige en particular a proteger el uso de los péptidos siguientes:

(1) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

(2) PyroGlu-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn

45

(3) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln

(4) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>

50

(5) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn

(6) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>

(7) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn

55

(8) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn

(9) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp

60

(10) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

(11) Gln-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn

(12) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln

65

(13) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>

(14) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn

## ES 2 272 811 T3

- (15) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- (16) Gln-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- 5 (17) Gln-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn
- (18) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp
- (19) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- 10 (20) Glu-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
- (21) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln
- 15 (22) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-β-Ala-NH<sub>2</sub>
- (23) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn
- (24) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- 20 (25) Glu-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- (26) Glu-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn
- 25 (27) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp
- (28) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- (29) Ala-Lys-Ata-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
- 30 (30) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln
- (31) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-β-Ala-NH<sub>2</sub>
- 35 (32) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn
- (33) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- (34) Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- 40 (35) Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn
- (36) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp
- 45 (37) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- (38) Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
- (39) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln
- 50 (40) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-β-Ala-NH<sub>2</sub>
- (41) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn
- 55 (42) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- (43) Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- (44) Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn
- 60 (45) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp

Más específicamente, la invención se dirige a proteger el uso de los péptidos siguientes:

- 65 (19) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- (1) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

## ES 2 272 811 T3

(10) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

(28) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

5 (37) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp

Estos péptidos se han estudiado en dos modelos de inflamación y de hiperalgesia en la rata, inducidos bien por inyecciones intraplantares (localizadas), bien por inyecciones intraperitoneales (sistémicas) de endotoxinas. El pretratamiento por estos péptidos lleva a abolir, de manera dependiente de la dosis, a la vez la hiperalgesia mecánica y la hiperalgesia térmica. Además, el pretratamiento reduce de forma significativa la hiperproducción de IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  y NGF debido a una inyección intraplantar de endotoxina. En el caso de una inyección intraperitoneal, que tiene como consecuencia un estado comparable al choque séptico (dolor, fiebre, somnolencia y anorexia), el pretratamiento previene la hiperalgesia y mantiene el cuerpo a una temperatura normal.

15 Finalmente, estos péptidos tienen efectos analgésicos idénticos o superiores a los de otros fármacos antiinflamatorios, sin inducir ningún cambio evidente de los parámetros fisiológicos o conductuales, para todas las dosis usadas.

Estos péptidos presentan así propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias.

20 Las propiedades analgésicas de estos péptidos se extienden igualmente a los dolores neurógenos (o dolores neuropáticos). Se han usado varios modelos para probar dolores neurógenos de orígenes diferentes: dos modelos animales de mononeuropatía y otro modelo de dolor de tipo somático o visceral. Estos modelos han permitido constatar una reducción significativa de la alodinia mecánica, y a veces, de la alodinia térmica. Las manifestaciones neuropáticas se encuentran inhibidas, mientras que el comportamiento ligado al dolor inducido por la inyección de sustancias irritantes (capsaicina) se reduce. En todos los casos, estos péptidos presentan efectos inhibidores tan importantes o más que los inducidos por los otros tratamientos usados en el caso de dolores neurógenos.

Teniendo en cuenta sus propiedades, el uso de estos péptidos se preconiza más en particular en el tratamiento de migrañas, ciáticas, neuropatías y dolores de origen inflamatorio agudos o crónicos.

30 Para una eficacia óptima, las dosis de administración deben estar comprendidas entre 0,01 y 1 mg/kg, efectuándose la administración por las vías más variadas, comprendidas parenteral, transcutánea o nasal.

35 Otros aspectos y ventajas de la invención se comprenderán mejor a la vista de los ejemplos siguientes y refiriéndose a las figuras que representan, respectivamente:

- la figura 1 ilustra la disminución, dependiente de la dosis de la hiperalgesia inducida por una inyección de endotoxinas,

40 - la figura 2 presenta un estudio comparativo de los efectos antihiperalgésicos de los péptidos según la invención con esteroides, antiinflamatorios no esteroideos y tripéptidos analgésicos,

- la figura 3 ilustra los efectos antiinflamatorios de un pretratamiento con los péptidos según la invención, por reducción de las concentraciones de citocinas proinflamatorias y de NGF,

45 - la figura 4 presenta los efectos del pretratamiento en el dolor (A y B) y en la fiebre (C) provocados por la inyección sistémica de endotoxinas simulando el choque séptico,

50 - la figura 5 ilustra la inhibición de la alodinia (dolor anormal provocado por estímulos inofensivos) y de la hiperpatía (reacción exagerada a una estimulación nociceptiva de intensidad moderada) en ratas que presentan una mononeuropatía CCI (por constricción crónica del nervio ciático), pretratadas con los péptidos según la invención,

55 - la figura 6 ilustra la inhibición de la alodinia y la hiperpatía en ratas que presentan una mononeuropatía SNI (dolor del nervio conservado de una pata desnervada), pretratadas con los péptidos según la invención,

- la figura 7 presenta un estudio de posología de los péptidos según la invención, en ratas que presentan los dos tipos precitados de mononeuropatía,

60 - la figura 8 presenta un estudio de posología de los péptidos según la invención, en ratas que presentan una hiperalgesia inducida por inyección de capsaicina (dolor neurógeno somático),

- la figura 9 ilustra la atenuación, por los péptidos según la invención, del dolor visceral inducido por una inyección intraperitoneal de capsaicina (dolor neurógeno espasmódico visceral),

65 - la figura 10 ilustra la comparación de diferentes fármacos en la neuropatía, y

- la figura 11 presenta los resultados de un tratamiento cotidiano por PAT.

## ES 2 272 811 T3

### Ejemplo 1

#### *Propiedades analgésicas y antiinflamatorias de los péptidos según la invención*

##### 5 1. Materiales y procedimientos

Los experimentos se han llevado a cabo en ratas Sprague-Dawley adultas, machos, de 200 a 250 g. Los animales se han criado en condiciones óptimas de luz y de temperatura (ciclo de 12 h de luz y de penumbra,  $22 \pm 3^\circ\text{C}$ ). El alimento y el agua se dispensaban *ad libitum*. Todos los experimentos se han llevado a cabo con el respeto a las directivas éticas relativas a las experimentaciones sobre el dolor realizadas en animales en estado consciente (Zimmermann M., 10 **1983**, *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*, Pain, **16**:109-110) y han sido aprobadas por el comité de la institución para el cuidado aplicado a los animales.

##### *Medidas conductuales*

15 Se han efectuado pruebas de dolores térmicos y mecánicos durante 3 días consecutivos antes de las inyecciones, con el fin de establecer un estado de referencia.

El umbral de nocicepción mecánica se ha determinado por la prueba de presión mecánica en la pata (PP), mientras que el de nocicepción térmica se ha determinado por las pruebas de la placa calefactora (HP), de inmersión de la pata en agua caliente (PI) y de flexión de la cola (TF).

La prueba PP se efectúa aplicando una presión constante de  $0,20 \text{ g/cm}^2$  alternativamente en las patas traseras izquierda y derecha con un intervalo de 5 minutos entre 2 presiones consecutivas. La presión se detiene cuando el animal presenta una reacción típica caracterizada por un vigoroso reflejo de flexión.

En la prueba HP, los animales se colocan individualmente en una placa calefactora ( $52,5^\circ\text{C} \pm 0,3^\circ\text{C}$ ). El umbral de dolor se mide por el tiempo de latencia transcurrido entre el momento en que el animal se coloca en la placa calefactora y el primer signo de dolor, indicado por el hecho de que el animal se lame la pata o salta.

30 En la prueba PI, las patas traseras son remojadas alternativamente en agua destilada a  $48^\circ\text{C}$  y el tiempo de latencia transcurrido hasta que se registra el primer signo de retirada de la pata.

En la prueba TF, la cola de cada animal se sumerge en agua destilada a  $50,5^\circ\text{C}$ . Se registra el tiempo de latencia puesto por el animal para retirarla. Los resultados se basan en 3 ensayos consecutivos efectuados con 5 minutos de intervalo.

##### *Administración de fármacos*

40 La hiperalgesia inflamatoria se ha establecido a partir de dos modelos animales: uno para una inflamación localizada y el otro una inflamación sistémica.

En el modelo dicho localizado, las ratas han recibido una inyección intraplantar de una solución ( $1,25 \mu\text{g}$  en  $50 \mu\text{l}$  de suero fisiológico al 9%) de endotoxinas (lipopolisacáridos de la *Salmonella typhasa*, Sigma) en una de las patas traseras, lo que provoca a la vez una hiperalgesia térmica y mecánica, restringida a la pata que ha recibido la inyección.

En el segundo modelo, las ratas reciben una inyección intraperitoneal de endotoxinas ( $25 \mu\text{g}$  en  $100 \mu\text{l}$  de suero fisiológico).

50 A continuación son posibles diversos tratamientos:

Protocolo 1(a): se han tratado diferentes grupos de ratas ( $n = 5$  en cada grupo) con el péptido análogo (PAT) Glu-Ala-lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp (sintetizado por Quantum Biotechnologies Inc., Canadá), de la manera siguiente:

55 - bien han recibido una inyección intraperitoneal ( $25 \mu\text{g}$  en  $50 \mu\text{l}$  de suero fisiológico) de este péptido,

- o bien se han pretratado con diferentes dosis de este péptido ( $1,5$  y  $25 \mu\text{g}$  en  $50 \mu\text{l}$  de cloruro de sodio) por inyección intraperitoneal, 30 minutos antes de la inyección de endotoxinas (ET) ( $1,25 \mu\text{g}$  en  $50 \mu\text{l}$  de suero fisiológico, en inyección intraplantar).

60 Protocolo 1(b): otros experimentos han tenido como finalidad comparar la eficacia de los péptidos análogos con la de los esteroides, AINE y los péptidos conocidos por su antagonismo de la hiperalgesia inducida por IL- $1\beta$  y las prostaglandinas.

65 Se ha pretratado un grupo de ratas con inyecciones intraperitoneales de Lys-D-Pro-Thr ( $10 \text{ mg/kg}$ ) en  $100 \mu\text{l}$  de suero fisiológico, 30 minutos antes de la inyección de PAT. Este tripéptido se conoce por su antagonismo de la hiperalgesia inducida por IL- $1\beta$  solamente.

## ES 2 272 811 T3

En el segundo grupo, las ratas han recibido inyecciones intraperitoneales del tripéptido Lys-D-Pro-Val (10 mg/kg) en 100  $\mu$ l de solución salina, 30 minutos antes de la inyección de PAT. Lys-D-Pro-Val es un antagonista de la hiperalgesia inducida por IL-1 $\beta$  y PGE<sub>2</sub>.

5 Las dosis usadas para estos tripéptidos son las descritas en el artículo de Safieh-Garabedian (Safieh-Garabedian B., Kanaan S.A., Haddad J.J., Abou Jaoude P., Jabbur S.J., Saade N.E. **1997**, *Involvement of interleukin-1 $\beta$ , nerve growth factor and prostaglandin-E2 in endotoxin induced localized inflammatory hyperalgesia*. Brit J. Pharmacol. 121:1619-1626).

10 Un tercer y un cuarto grupo se han tratado con dexametasona e indometacina.

El fosfato de dexametasona disuelto en una solución de sodio al 9‰ se ha inyectado, a la concentración de 200  $\mu$ g/kg, justo antes y 3 horas después de la inyección de ET.

15 La indometacina se ha preparado disolviendo indometacina lactosa en una solución de tampón salino (pH 7,4) y se ha inyectado, a la concentración de 4 mg/kg, justo antes y 3 horas después de la inyección de ET.

Todas las pruebas de los experimentos posteriores se han efectuado 9 horas después de la inyección de ET. Esto coincide con el pico de hiperalgesia en este modelo. Las inyecciones de solución salina (50-100  $\mu$ l en intraplantar) no han mostrado alteración significativa del umbral del dolor.

20 Protocolo 2(a): Un grupo de ratas ha recibido una inyección intraperitoneal de ET (50  $\mu$ g) mientras que el otro grupo ha sido pretratado con el péptido análogo a la timulina (PAT) (25  $\mu$ g, inyección intraperitoneal), 30 minutos antes de la inyección de ET.

25 A continuación se han efectuado las pruebas TF y PP 1 hora, 3 horas y 6 horas después de la inyección de ET.

Protocolo 2(b): Se han tratado diferentes grupos de ratas (n = 5 en cada grupo) de la manera siguiente:

30 - bien han recibido una inyección intraperitoneal de 50  $\mu$ g de ET,

- o bien han sido pretratados con el péptido PAT (25  $\mu$ g, inyección intraperitoneal), 30 minutos antes de una inyección de endotoxina.

35 La temperatura rectal se ha medido a 1 hora, 3 horas y 6 horas.

Un grupo de control ha recibido una inyección intraperitoneal de péptido PAT (25  $\mu$ g disuelto en 100  $\mu$ l de solución salina).

40 *Citocinas y factor de crecimiento nervioso (NGF)*

Estos experimentos tienen necesidad de muestras de tejidos. Los animales se anestesian justo antes de la muerte (pentobarbital de sodio, 50 mg/kg) y se toma una muestra de la piel de las patas traseras bien 1 h (para la determinación del nivel de TNF $\alpha$ ) o bien 4 h (para la determinación de IL-1 $\beta$ , IL-6 y NGF) después de la inyección de endotoxina.

45 Las muestras de tejidos se pesan y después se congelan rápidamente y se almacenan a -70°C con vistas a proceder a la evaluación de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 y NGF.

50 En otra serie de experimentos, se toman muestras de los tejidos según se describe anteriormente, en diferentes grupos de ratas, unos pretratados con el PAT, 30 minutos antes de la inyección de ET, y los otros habiendo sido solamente inyectados con PAT.

55 Los tejidos se homogenizan en una solución tampón de fosfato (PBS, pH = 7,4), que contiene 0,4 M de NaCl, el 0,05% de Tween-20®, el 0,5% de albúmina de suero bovino (BSA), 0,1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 0,1 mM de cloruro de bencetonio, 10 mM de EDTA y 20 KI/ml de aprotinina.

A continuación se centrifuga la mezcla a 1.200 g durante 60 minutos a 4°C. Las citocinas y el NGF contenidos en el sobrenadante se han medido mediante pruebas ELISA.

60 El NGF se mide con ayuda de un kit inmunológico (Promega) según las instrucciones recomendadas por el fabricante.

65 La medida de las citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 se ha efectuado según los protocolos descritos por Safieh-Garabedian (Safieh-Garabedian B., Dardenne M., Kanaan S.A., Atweh S.F., Jabbur S.J., Saadé N.E. **2000**. *The role of cytokines and prostaglandin-E2 in thymulin induced hyperalgesia*. Neuropharmacology 39:1653-1661).

*Análisis estadístico y tratamiento de los datos*

Se ha definido un valor de umbral de dolor, para las diferentes pruebas de la nocicepción, para cada grupo de animales. Los datos obtenidos para cada fármaco sometido a prueba se han comparado bien con el testigo establecido antes de la inyección o bien con dos tipos de testigos: una serie de animales que han recibido una inyección de ET y otra serie de animales que han recibido una inyección de solución de cloruro de sodio al 9%.

Para la evaluación de los niveles de citocinas y de NGF, se han comparado los valores obtenidos en animales inyectados con ET solamente, fármaco solamente o ET más fármaco con los valores obtenidos en grupos de animales de control inyectados con una solución de cloruro de sodio al 9%.

La importancia de la desviación típica se ha establecido mediante ANOVA seguido de una prueba de Bonferroni.

*2. Resultados**Efecto del péptido PAT en la hiperalgesia inflamatoria provocada por la inyección intraplantar de ET*

La inyección intraplantar de ET (1,25  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina) en la pata trasera de ratas ha conllevado una disminución significativa de los umbrales nociceptivos medidos 9 h (pico de hiperalgesia) después de la prueba PP (0,87  $\pm$  0,09 s frente a 2,06  $\pm$  0,06 s para la solución salina de control,  $P < 0,001$ ) para la hiperalgesia mecánica y después de las pruebas PI (1,25  $\pm$  0,04 s frente a 1,97  $\pm$  0,05 s para la solución salina de control,  $P < 0,001$ ), HP (6,0  $\pm$  0,18 frente a 9,24  $\pm$  0,16 s para la solución salina de control,  $P < 0,001$ ) y TF (2,40  $\pm$  0,06 s frente a 3,19  $\pm$  0,08 s para la solución salina de control,  $P < 0,001$ ) para la hiperalgesia térmica. El tratamiento por el péptido PAT (1,5 y 25  $\mu\text{g}$ ) ha reducido de manera dependiente de la dosis la hiperalgesia provocada por la inyección de ET (fig. 1). Con la dosis de 25  $\mu\text{g}$  de PAT, las latencias de desencadenamiento de las diversas respuestas han sido de 2,05  $\pm$  0,07 s, 1,94  $\pm$  0,005 s, 9,12  $\pm$  0,7 s y 3,22  $\pm$  0,09 s para las pruebas PP, PI, HP y TF, respectivamente ( $p > 0,05$  para todos los valores en comparación con el estado o con los valores obtenidos con la solución salina). La inyección intraperitoneal de PAT en solitario (25  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{l}$  de solución salina) no ha conllevado modificación significativa de los tiempos de latencia para las diferentes pruebas de dolor.

*Comparación de la eficacia del péptido PAT con otros medicamentos y análogos*

Cuando se compara el efecto de PAT en la hiperalgesia provocada por una inyección intraplantar de ET (1,25  $\mu\text{g}$ ) con los efectos obtenidos con un esteroide, un AINE y los péptidos Lys-D-Pro-Val y Lys-D-Pro-Thr, los resultados obtenidos demuestran que PAT es un agente analgésico mucho más eficaz que los péptidos Lys-D-Pro-Val y Lys-D-Pro-Thr (fig. 2). PAT tiene efectos similares a los de la indometacina y la dexametasona, pero con concentraciones mucho menores (fig. 2).

*Efecto de PAT en las citocinas*

La inyección de endotoxinas en la pata trasera de ratas ha conllevado un aumento significativo ( $P < 0,001$ ) de las concentraciones de citocinas proinflamatorias y de NGF en comparación con ratas a las que se había inyectado la solución salina, o con las patas de las mismas ratas que no han recibido ningún producto. Una hora después de la inyección de ET, la concentración de TNF- $\alpha$  era de 345,0  $\pm$  61,0 pg/pata frente a 100,0  $\pm$  8,00 pg/pata después de inyección de solución salina de control. Tres horas después de inyección de ET, la concentración de IL-1R era de 2.850,6  $\pm$  255,4 pg/pata frente a 400,0  $\pm$  45,0 pg/pata después de inyección de la solución salina de control, la concentración de IL-6 era de 2.831,0  $\pm$  285,0 pg/pata frente a 250,0  $\pm$  50,0 pg/pata para la solución salina de control y la concentración de NGF era de 23,0  $\pm$  1,73 ng/pata frente a 9,11  $\pm$  1,6 ng/pata para la solución salina de control.

El tratamiento previo por PAT ha anulado el aumento de la concentración de TNF- $\alpha$  y ha reducido de manera significativa las concentraciones de IL-1 $\beta$  (de 2.850,6  $\pm$  255,4 a 1.686,0  $\pm$  266,0 pg/pata,  $P < 0,01$ ), de IL-6 (de 2.831  $\pm$  285 a 1.158  $\pm$  197,0 pg/pata,  $P < 0,001$ ) y de NGF (de 23,0  $\pm$  1,73 a 16,73  $\pm$  2,70 ng/pata,  $P < 0,001$ ) (fig. 3A, B, C y D). Las inyecciones de PAT (25  $\mu\text{g}$ ) en animales de control no han conllevado modificación significativa de las concentraciones de citocinas ni de NGF, como muestra la fig. 3.

*Efecto de PAT en la hiperalgesia inflamatoria sistémica provocada por ET*

Las inyecciones de ET (50  $\mu\text{g}$ , i.p.) han conllevado una disminución significativa de los umbrales nociceptivos una hora después de la prueba PP (1,13  $\pm$  0,06 frente a 2,03  $\pm$  0,04 s para los controles,  $P < 0,001$ ) y después de la prueba TF (2,27  $\pm$  0,06 frente a 3,08  $\pm$  0,04 s para los controles,  $P < 0,001$ ). La hiperalgesia permanece evidente durante seis a nueve horas después de la inyección (fig. 4A y 4B). Un tratamiento previo por inyección intraperitoneal de PAT (25  $\mu\text{g}$ ) treinta minutos antes de administración sistémica de ET ha abolido la hiperalgesia mecánica (fig. 4A) y la hiperalgesia térmica (fig. 4B) producidas por ET.

La endotoxina es un pirógeno conocido y su inyección ha conllevado un aumento significativo de la temperatura corporal al cabo de una hora (38,43  $\pm$  0,028°C frente a 37,65  $\pm$  0,16°C para los controles). A continuación, la temperatura ha permanecido significativamente elevada seis horas (fig. 4C). Un tratamiento previo por PAT en inyección

intraperitoneal (25 µg) ha anulado el procedimiento de elevación de la temperatura corporal provocado por ET y los valores no han sido significativamente diferentes de los de los controles (fig. 4C).

## Ejemplo 2

5

### *Propiedades analgésicas de un péptido según la invención (PAT) en el dolor de origen neurógeno*

#### 1. Materiales y procedimientos

10 Para estos ensayos se han usado ratas macho Sprague-Dawley adultas (250-300 g). Durante el período de experimentación, las ratas se han colocado en condiciones estándar (4 a 5 individuos por jaula, ciclo día/noche de 12 horas, 22,2°C), con acceso libre a agua y al alimento. Los procedimientos quirúrgicos necesarios se han practicado bajo anestesia profunda con cetamina (Ketalar®, 40-50 mg/kg, inyección intraperitoneal), precedida de una preanestesia con clorpromazina (8 mg/kg, ídem) y atropina (0,05 mg/kg, ídem).

15

Este estudio se ha basado en dos protocolos experimentales para la inducción del dolor de origen neurógeno. El primer protocolo ha usado dos modelos animales de mononeuropatía. El segundo protocolo se ha basado en la inyección de capsaicina, sustancia conocida por activar grupos específicos de fibras aferentes implicadas en la señalización nociceptiva.

20

#### a) Protocolo I

##### *Modelos animales de mononeuropatía*

25

##### *Inducción de la mononeuropatía*

La mononeuropatía ha sido provocada en grupos de ratas diferentes (n = 6 ratas en cada grupo) según el modelo CCI (chronic constriction injury, constricción crónica del nervio, Bennet G.J. y Xie Y.K., **1988**, *A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man*, Pain, **33**:87-107) o según el modelo SNI (spared nerve injury, nervio conservado de la pata desnervada, Decosterd I. y Woolf C.J., **2000**, *Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain*, Pain, **87**:149-158). El nervio ciático se ha expuesto después de sección de la parte posterior del muslo y por incisión a través de la piel y la capa de grasa que recubre el hueso poplíteo. Para el modelo CCI, se han colocado cuatro ligaduras laxas (catgut cromado 4,0) en el lado proximal de la trifurcación ciática. Para el modelo SNI, se han aislado el nervio ciático poplíteo externo y el nervio ciático poplíteo interno, se han ligado estrechamente y se han seccionado, mientras que el nervio sural que inerva el aspecto lateral de la pata se ha dejado intacto.

35

##### *Pruebas conductuales*

40 Las ratas se han colocado en compartimentos individuales de una jaula cuyo suelo estaba hecho de rejilla metálica, lo que permite alcanzar el cojinete plantar y el aspecto lateral de la pata con filamentos.

Para la alodinia mecánica, se ha tocado la superficie plantar de las patas traseras (superficie lateral para el modelo SNI y superficie plantar mediana para el modelo CCI) con filamentos de Von Frey (VFF 4,31 y 5,07, Stoelting Co., EE.UU.), lo que correspondía a fuerzas de 2,041 y 11,749 g (18,5 y 106,7 mN), respectivamente. Las fuerzas de flexión de estos filamentos demuestran ser insuficientes para conllevar reflejos de retirada nociceptivos en los animales normales. Para cada rata se ha establecido el número de retiradas de pata provocado por 10 ensayos en cada pata trasera antes (estado basal) y después de la inducción de la mononeuropatía. En las ratas normales, los filamentos de calibre bajo (VFF 4,31) y de calibre alto (VFF 5,07) han provocado en promedio  $1,3 \pm 0,2$  y  $2,7 \pm 0,3$  respuestas/10 ensayos

50

Después de inducción de la neuropatía, los dos filamentos han provocado más de 5 respuestas/10 ensayos.

55 Se ha usado el procedimiento descrito por Chol y col. (**1994**, *Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain*, Pain, **59**:369-376) para la evaluación de la alodinia al frío. Consiste en aplicar algunas gotas (50 µl aproximadamente) de una solución de acetona en la pata y de medir la duración de la reacción de retirada. Los valores elegidos arbitrariamente para servir de umbral mínimo y máximo son un semisegundo y 20 segundos, respectivamente.

60 En la rata normal se ha establecido la duración (D) de retirada de la pata (RP) en respuesta a un rayo nociceptivo de calor radiante orientado hacia la superficie plantar. El aumento de la DRP después de inducción de la mononeuropatía se ha considerado como una indicación de hiperpatía. Cada rata se ha sometido a dos pruebas RP por sesión, cada cinco minutos como mínimo.

65 Las manifestaciones neuropáticas han sido máximas de siete a diez días después de inducción de la neuropatía. Durante este período se han sometido a prueba los efectos de las inyecciones de PAT, que corresponde al pico de la neuropatía.

## b) Protocolo II

*Irritación química de las aferencias nociceptivas*

5 Este protocolo se basaba en las propiedades establecidas de la capsaicina, que irrita de manera selectiva un grupo específico de fibras aferentes (denominadas “capsaicin sensitive primary afferents” o CSPA, fibras aferentes primarias sensibles a la capsaicina) conocidas por provocar una inflamación neurógena y por transmitir la información nociceptiva (para una revisión, ver Szolcsanyi J., 1996, *Neurogenic inflammation: reevaluation of axon reflex theory*, En: Geppetti P. y Holzer P. (eds.), *Neurogenic Inflammation*, pág. 33-42. CRC Press, Boca Raton).

10 Nuestro grupo ha puesto a punto dos procedimientos: inyección intraplantar (i.pl.) e intraperitoneal (i.P.) de pequeñas cantidades de capsaicina con el fin de provocar dolores reversibles somáticos y viscerales, respectivamente.

*Inyección intraplantar de capsaicina*

15 La inyección de capsaicina (10  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{l}$  de una solución al 10% de Tween 20 en aceite de oliva) ha conllevado una hiperalgesia cuyo pico ha tenido lugar de tres a seis horas después de inyección y que ha desaparecido al cabo de 24 horas. La hiperalgesia mecánica se ha evaluado con ayuda de la prueba de presión en la pata (PP) que ha consistido en aplicar una presión constante de 0,2 kg/cm en la parte dorsal de la pata trasera. El tiempo transcurrido entre la aplicación de la presión y el reflejo nociceptivo de retirada de la pata se ha considerado como el tiempo de latencia (o umbral) de nocicepción mecánica. La hiperalgesia térmica se ha evaluado con ayuda de la prueba de la placa calefactora (HP) y de la prueba de la inmersión de la pata (PI).

20 Las pruebas HP y PI se han realizado como en el ejemplo 1, teniendo la placa calefactora una temperatura de  $52,5 \pm 0,3^\circ\text{C}$  y el recipiente de agua caliente, de  $48 \pm 0,3^\circ\text{C}$ .

Las pruebas PP y PI se han practicado una después de otra en las dos patas traseras respetando un intervalo de cinco minutos entre dos pruebas consecutivas.

30 Se han llevado las ratas al laboratorio una semana antes de la inyección con el fin de que se familiaricen con el entorno y se han practicado las pruebas en las ratas dos o tres días con el fin de establecer el valor de inicio para cada prueba antes de todo tratamiento (descripción detallada en Kanaan S.A. y col., 1996, *Endotoxin-induced local inflammation and hyperalgesia in rats and mice: a new model for inflammatory pain*, Pain, 66:373-379).

*Inyección intraperitoneal de capsaicina*

35 Esta prueba consistía en inyectar (i.P.) 20  $\mu\text{g}$  de capsaicina en 100  $\mu\text{l}$  de una solución del 10% de Tween 20 en aceite de oliva, a ratas y en observar el comportamiento provocado por estas inyecciones. Se ha ideado una escala conductual de 4 niveles según el procedimiento descrito por Giesler GJ y col., (1976, *Inhibition of visceral pain by electrical stimulation of the periaqueductal gray matter*, Pain 2:43-48).

40 Los niveles se han definido del modo siguiente: 0 = comportamiento normal; 1 = ligera contracción de los músculos abdominales; 2 = contracción de un solo lado y luxación del anca por hundimiento; 3 = contracción importante de los músculos abdominales y extensión de las dos patas traseras.

45 Para la evaluación del comportamiento de los animales, se ha colocado cada rata en una jaula transparente colocada asimismo encima de un espejo inclinado  $45^\circ$  para una observación óptima.

50 Los comportamientos normales y nociceptivos se han registrado por parte de un observador con ayuda de un polígrafo y se ha contado el tiempo correspondiente a cada nivel en un período de 30 minutos en los registros del polígrafo por parte de otro observador. Ninguno de los dos observadores conocía la inyección practicada ni los efectos esperados.

*Medicamentos inyectados*

55 El péptido PAT usado es el mismo que en el ejemplo 1. El PAT se ha disuelto en agua destilada y administrado en inyección i.P, a una concentración y según una planificación apropiadas según el tipo de experimento.

60 La capsaicina (8-metil-N, Vanillyl-Nonanamide, Sigma #M1022) se ha disuelto en una solución al 10% de Tween 20 en aceite de oliva y se ha administrado en i.p. o en i.pl. a la concentración apropiada.

*Análisis de los datos*

65 En el curso de los experimentos realizados en ratas que sufren neuropatía, se han evaluado la alodinia y la hiperpatía en cada grupo de animales en referencia al estado basal establecido antes de inducción de la mononeuropatía. Por ejemplo, se ha calculado la media del número de retiradas de la pata provocadas por cada VFF para todas las ratas de cada grupo y se ha determinado la variación de esta media después de tratamiento por PAT en intervalos de tiempo diferentes después de la inyección. Se ha seguido el mismo procedimiento para la alodinia al frío y la hiperpatía al calor.

En el curso de los experimentos que implican la inyección i.pl. de capsaicina, se ha calculado la media de las medidas efectuadas con ayuda de cada prueba del dolor (PP, HP o PI) para cada grupo de ratas antes de la inyección de la capsaicina (estado basal) y en intervalos de tiempo diferentes después de la inyección (3, 6, 9 y 24 horas). Se ha inyectado el PAT (en i.p.) treinta minutos antes de la capsaicina y se han medido los tiempos de latencia de las diferentes pruebas del dolor en los mismos intervalos de tiempo después de inyección de la capsaicina.

Para la inyección i.P. de capsaicina, se ha medido el tiempo total que corresponde a cada nivel conductual para los animales que hayan recibido la capsaicina únicamente o la capsaicina después del PAT. Se han evaluado la variación de las manifestaciones neuropáticas o de las pruebas del dolor después de los tratamientos por ANOVA y después por pruebas post hoc de Bonferroni. Se han evaluado las variaciones de las puntuaciones de dolor con o sin tratamiento mediante la prueba T de Student bilateral tomando como límite de significancia el 5% ( $P < 0,05$ ).

## 2. Resultados

### *Efectos de la inyección de PAT en las manifestaciones neuropáticas*

La inyección de PAT (5  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$ , i.P.) a las ratas de dos grupos ( $n = 6$  ratas por grupo) expuestas a una neuropatía provocada por CCI o SNI ha conllevado una atenuación significativa de todas las manifestaciones neuropáticas (fig. 5 y 6). Este efecto ha sido máximo dos horas después de inyección para la alodinia mecánica. Ha sido máximo 75 minutos después de inyección para la alodinia al frío y la hiperpatía en el modelo CCI y para todas las manifestaciones neuropáticas en el modelo SNI. Sin embargo, la alodinia al frío sólo se ha reducido moderadamente por el PAT en el modelo SNI. Se ha observado la reversibilidad de los efectos del PAT de tres a cuatro horas después de la inyección.

Se han evaluado los efectos de dosis de PAT de 1 y 25  $\mu\text{g}$  en otros grupos de ratas según los dos modelos. La figura 7 muestra que la atenuación de las manifestaciones neuropáticas ha sido máxima con una dosis de 5  $\mu\text{g}$ /rata.

Un tratamiento cotidiano por PAT (1  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$ ) durante 5 días consecutivos produce una disminución progresiva de las manifestaciones de la alodinia así como una potenciación de los efectos de cada inyección. La prueba más evidente de esta potenciación es la inhibición aumentada de la alodinia al frío que se modificaba poco con una sola inyección de PAT (ver Figura 11).

Se han comparado los efectos del tratamiento por PAT en las manifestaciones de la neuropatía con los observados con las inyecciones, bien de meloxicam (5 mg/kg, i.p.) o bien de morfina (4 mg/kg, i.p.) a otros dos grupos de ratas ( $n = 6$ ). El tratamiento por PAT induce una reducción más importante de la alodinia táctil y de la hiperalgesia térmica que la observada con los otros dos fármacos, y a una dosis mucho más débil. La figura 10 ilustra esta comparación. Cada fármaco se inyecta a un grupo diferente ( $n = 6$ ) de ratas expuestas a una neuropatía provocada por SNI. Todas las medidas se han realizado en el pico de actividad de cada fármaco (45 a 60 min después de la inyección). Los controles corresponden a las medidas realizadas en las ratas expuestas a una neuropatía antes de todo tratamiento.

### *Efectos del tratamiento por PAT en la hiperalgesia provocada por la inyección i.pl. de capsaicina*

La inyección intraplantar de capsaicina (10  $\mu\text{g}$  en 50  $\mu\text{l}$ ) ha conllevado una disminución significativa de los tiempos de latencia (hiperalgesia) observados durante diferentes pruebas de dolor. Esta disminución ha sido máxima al cabo de tres a seis horas y ha desaparecido 24 horas después de la inyección (Saadé N.E., Massaad C.A., Ochoa-Chaar C.L, Atweh S.F., Safieh-Garabedian B., Jabbur S.J. **2000**. *Possible contribution of neuropeptides and histamine to the hyperalgesia induced by intraplantar injection of capsaicin*. Eur. J. Neurosci. Abst. (supl 11, Vol. 12:123). Se ha inyectado a diferentes grupos de ratas ( $n = 5$  ratas en cada grupo) bien capsaicina o bien PAT (i.P.) y después capsaicina al cabo de treinta minutos, a dosis de 1,5 ó 25  $\mu\text{g}$ /rata. El tratamiento previo por el PAT ha conllevado una atenuación dependiente de la dosis de la hiperalgesia provocada por la capsaicina (fig. 8). Para la dosis más elevada, la inyección de PAT ha conllevado una prevención completa de la hiperalgesia provocada por la capsaicina. La inyección de una dosis de 25  $\mu\text{g}$  de PAT no ha conllevado modificación significativa de los tiempos de latencia observados durante diferentes pruebas de dolor (fig. 8, controles).

### *Efectos de la inyección de PAT en el dolor visceral provocado por la capsaicina*

Las ratas ( $n = 6$ ) que han recibido una inyección i.P. de capsaicina (20  $\mu\text{g}$  en 100  $\mu\text{l}$ ) han tenido una respuesta que corresponde al nivel 0 durante  $0,2 \pm 0,3$  minutos, al nivel 1 durante  $2,51 \pm 0,45$  minutos, al nivel 2 durante  $21,5 \pm 0,8$  minutos y al nivel 3 durante  $11,84 \pm 0,43$  minutos durante un período de observación total de 36 minutos (fig. 9).

En otro grupo de ratas ( $n = 6$ ), la inyección de PAT (50  $\mu\text{g}$  en 200  $\mu\text{l}$ /rata) antes de la inyección de capsaicina (20  $\mu\text{g}$ , i.p.) ha conllevado las puntuaciones de dolores siguientes:  $0,82 \pm 0,18$  minutos correspondiente al nivel 0,  $12,89 \pm 2,5$  minutos correspondiente al nivel 1,  $15,62 \pm 0,9$  minutos correspondiente al nivel 2 y  $6,67 \pm 0,09$  minutos correspondiente al nivel 3. Así, el tratamiento previo por PAT ha conllevado un desplazamiento significativo hacia la izquierda de las puntuaciones de nocicepción provocado por la capsaicina (fig. 9).

## ES 2 272 811 T3

### Ejemplo 3

#### *Uso de PAT para fabricar una solución inyectable*

5 - PAT: 0,05 mg

- Agua destilada estéril libre de pirógenos: 1,0 ml.

Esterilización por filtrado, acondicionamiento en ampolla, frascos o frascos de dosis múltiples.

10 Las vías de administración posibles son las inyecciones intraperitoneales, subcutáneas, intracerebrales, intramusculares e intradérmicas.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Uso de péptidos análogos de la timulina salvo la timulina, inactivos con respecto al sistema inmunitario, que no comportan cinc y que presentan una actividad antidolor, para fabricar un medicamento destinado al tratamiento del dolor.

2. Uso de los péptidos según la reivindicación 1, **caracterizado** porque dichos péptidos presentan la secuencia siguiente:

X-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn

en la que X representa Ser, Lys-Ser, Ala-Lys-Ser, Glu-Ala-Lys-Ser, Gln-Ala-Lys-Ser, PyroGlu-Ala-Lys-Ser, así como toda secuencia derivada que comporta 1 ó 2 aminoácidos modificados, siendo las modificaciones posibles de la naturaleza siguiente:

PyroGlu: D-PyroGlu, Glu, Gln

Gln: Z-Gln, D-Gln, Pro, Cys (S-CONH<sub>2</sub>), Met(O), Glu, Glu (γ-ciano), Glu(γCS-NH<sub>2</sub>), D-Glu, Asn, NorVal

Ala: D-Ala, Z-Ala, Ac-Ala

Lys: Arg, D-Lys, N-γ-Z-Lys, Lys(N<sup>6</sup>-acetil), Orn, Har, 2-amino-hexanoílo, 2,6-diamino-hexinoílo, 2,6-diamino-hexenoílo, Hep, D-Lys(N<sup>6</sup>-acetil)

Ser: Ala, (N-metil)Ser, D-Ser, Thr

Gly: Ala, Ser, D-Ala, D-Leu

Asn: CyanoAla, Thio-Asn, Asp, Gln, Glu, β-Ala-NH<sub>2</sub>, D-Asn, Asn-NH<sub>2</sub> con la exclusión de la secuencia PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn.

3. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 y 2, **caracterizado** porque los péptidos son los siguientes:

- (1) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- (2) PyroGlu-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
- (3) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln
- (4) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-β-Ala-NH<sub>2</sub>
- (5) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn
- (6) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- (7) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- (8) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn
- (9) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp
- (10) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp
- (11) Gln-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn
- (12) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln
- (13) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-β-Ala-NH<sub>2</sub>
- (14) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn
- (15) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>
- (16) Gln-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn
- (17) Gln-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn

## ES 2 272 811 T3

- (18) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp  
(19) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
5 (20) Glu-Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn  
(21) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln  
(22) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>  
10 (23) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn  
(24) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>  
15 (25) Glu-Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn  
(26) Glu-Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn  
(27) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp  
20 (28) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
(29) Ala-Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn  
25 (30) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln  
(31) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>  
(32) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn  
30 (33) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>  
(34) Ala-Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn  
35 (35) Ala-Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn  
(36) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp  
(37) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
40 (38) Lys-Ala-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn  
(39) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Gln  
45 (40) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser- $\beta$ -Ala-NH<sub>2</sub>  
(41) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-D-Asn  
(42) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asn-NH<sub>2</sub>  
50 (43) Lys-Ser-Asn-Gly-Gly-Ser-Asn  
(44) Lys-Ser-Nva-Gly-Gly-Ser-Asn  
55 (45) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ala-Asp.

4. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 3, **caracterizado** porque los péptidos son los siguientes:

- (19) Glu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
60 (1) PyroGlu-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
(10) Gln-Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
65 (28) Ala-Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp  
(37) Lys-Ser-Gln-Gly-Gly-Ser-Asp.

## ES 2 272 811 T3

5. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque el medicamento posee propiedades analgésicas y/o antiinflamatorias.

5 6. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 5 para el tratamiento del dolor engendrado por migraña, ciática, neuropatía y/o los dolores inflamatorios agudos o crónicos.

7. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 6, **caracterizado** porque las dosis administradas están comprendidas entre 1  $\mu\text{g}$  y 10 mg/kg.

10 8. Uso de los péptidos según las reivindicaciones 1 a 7, **caracterizado** porque el medicamento se formula de manera que permite una administración por vía parenteral o nasal.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

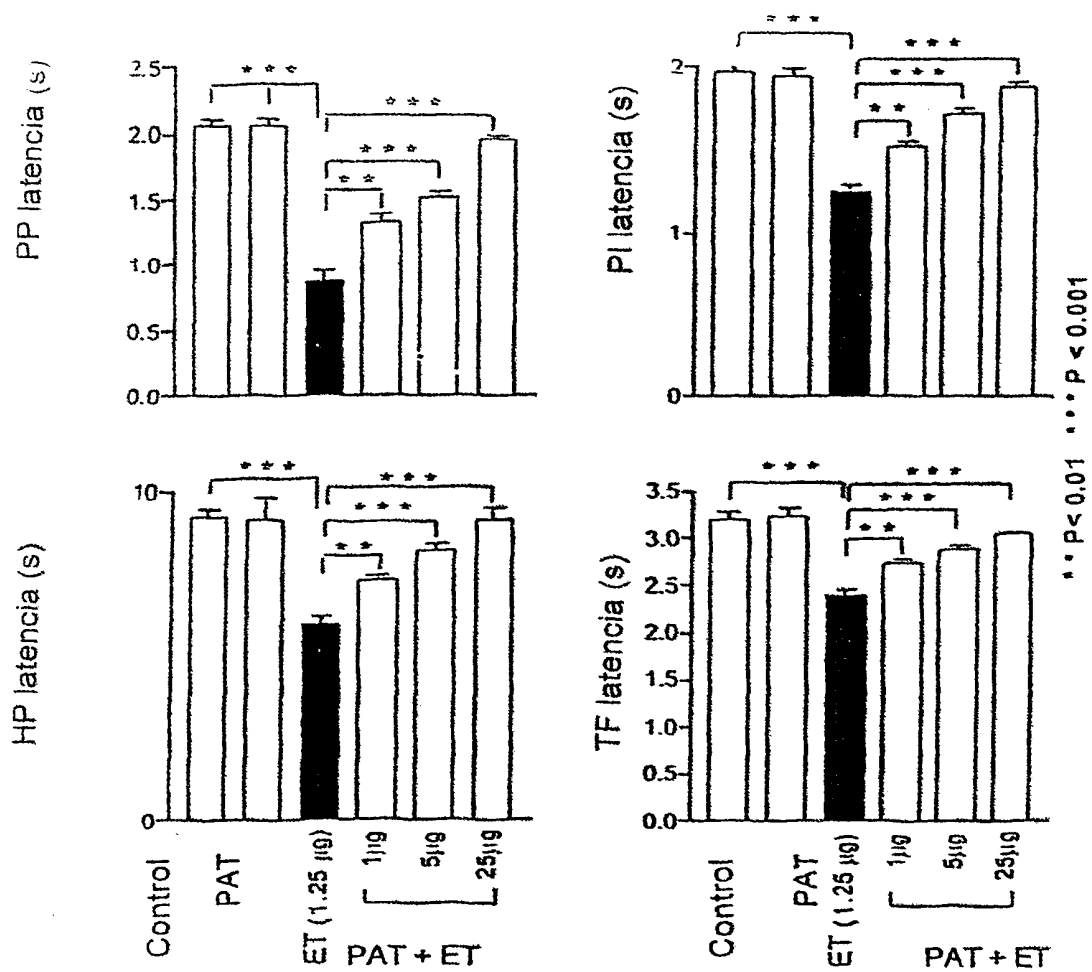


Figura 1

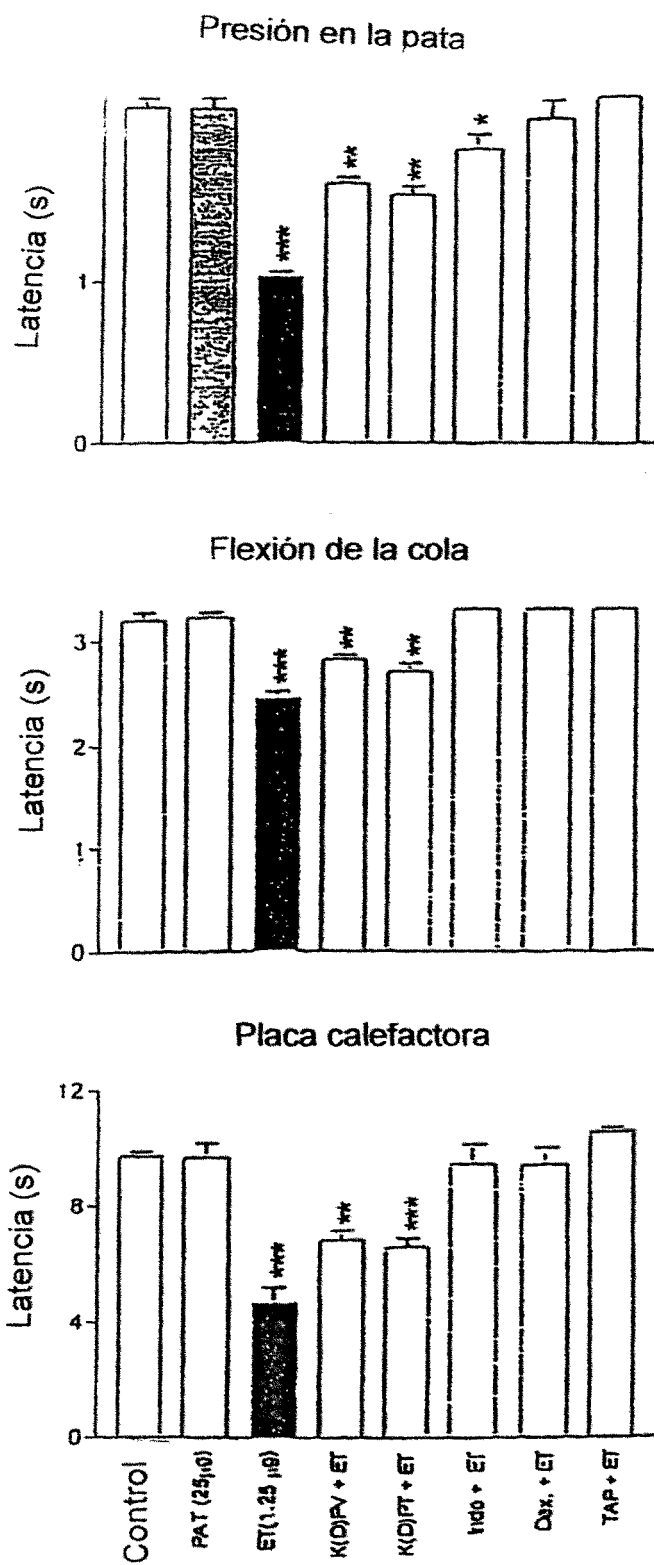


Figura 2

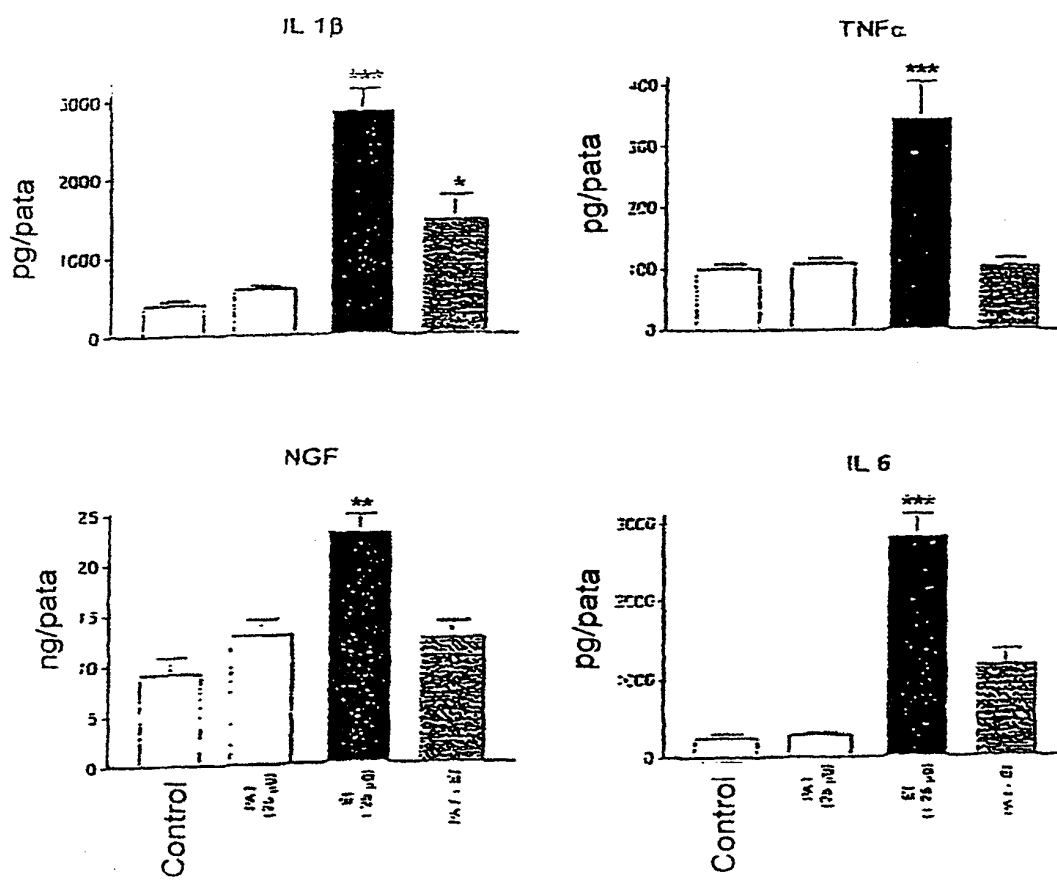


Figura 3

Figura 4

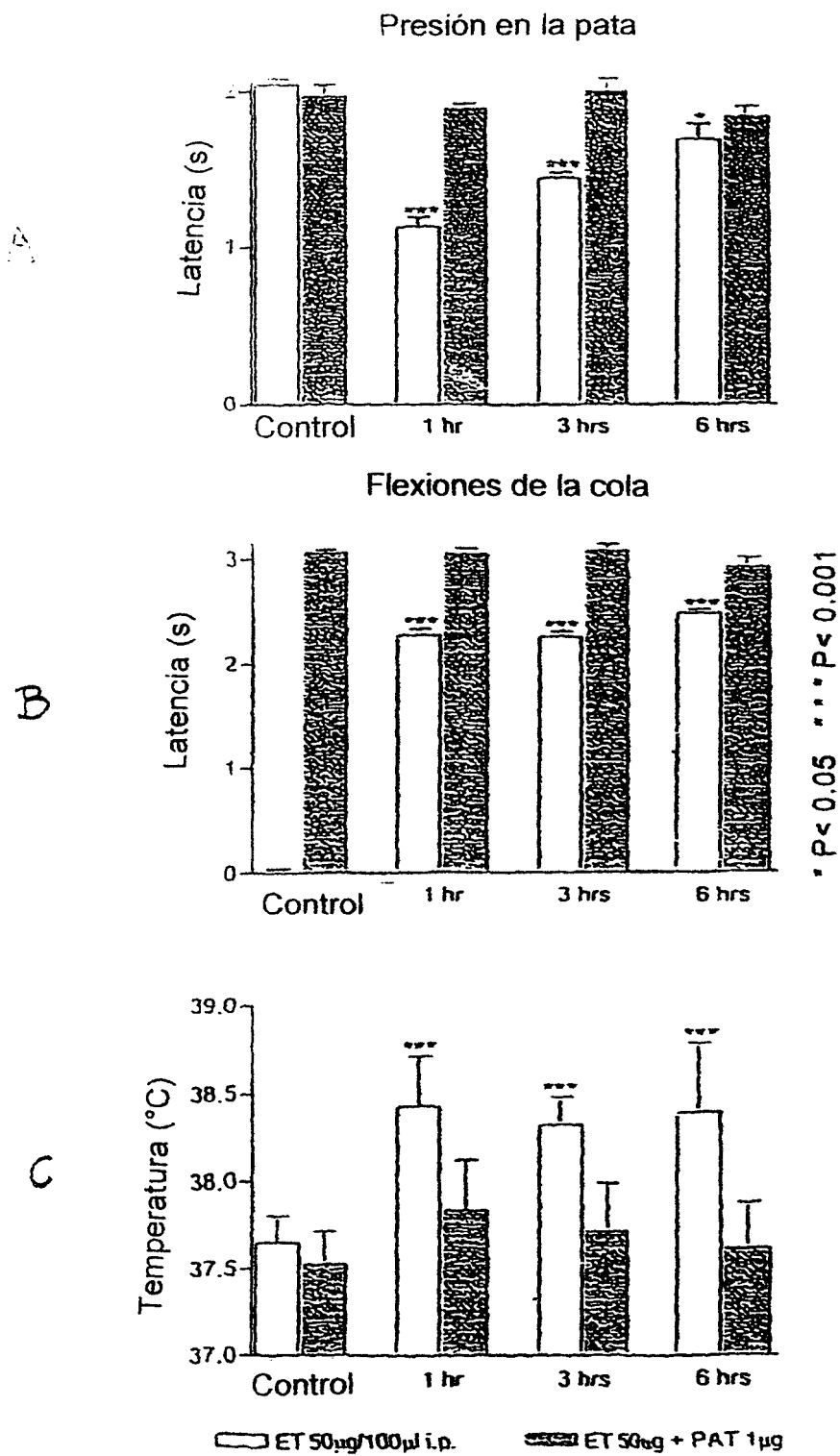
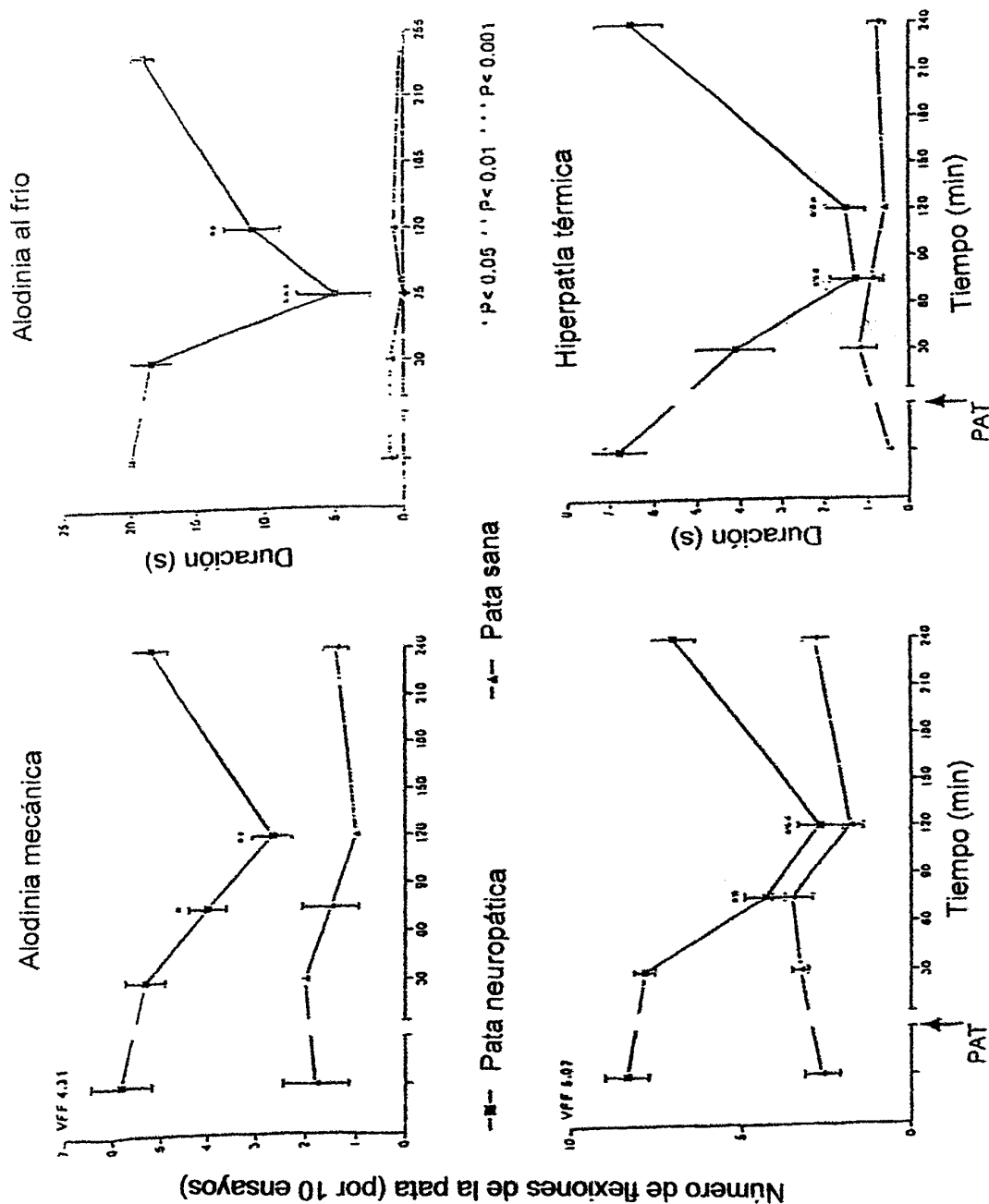


Figura 5



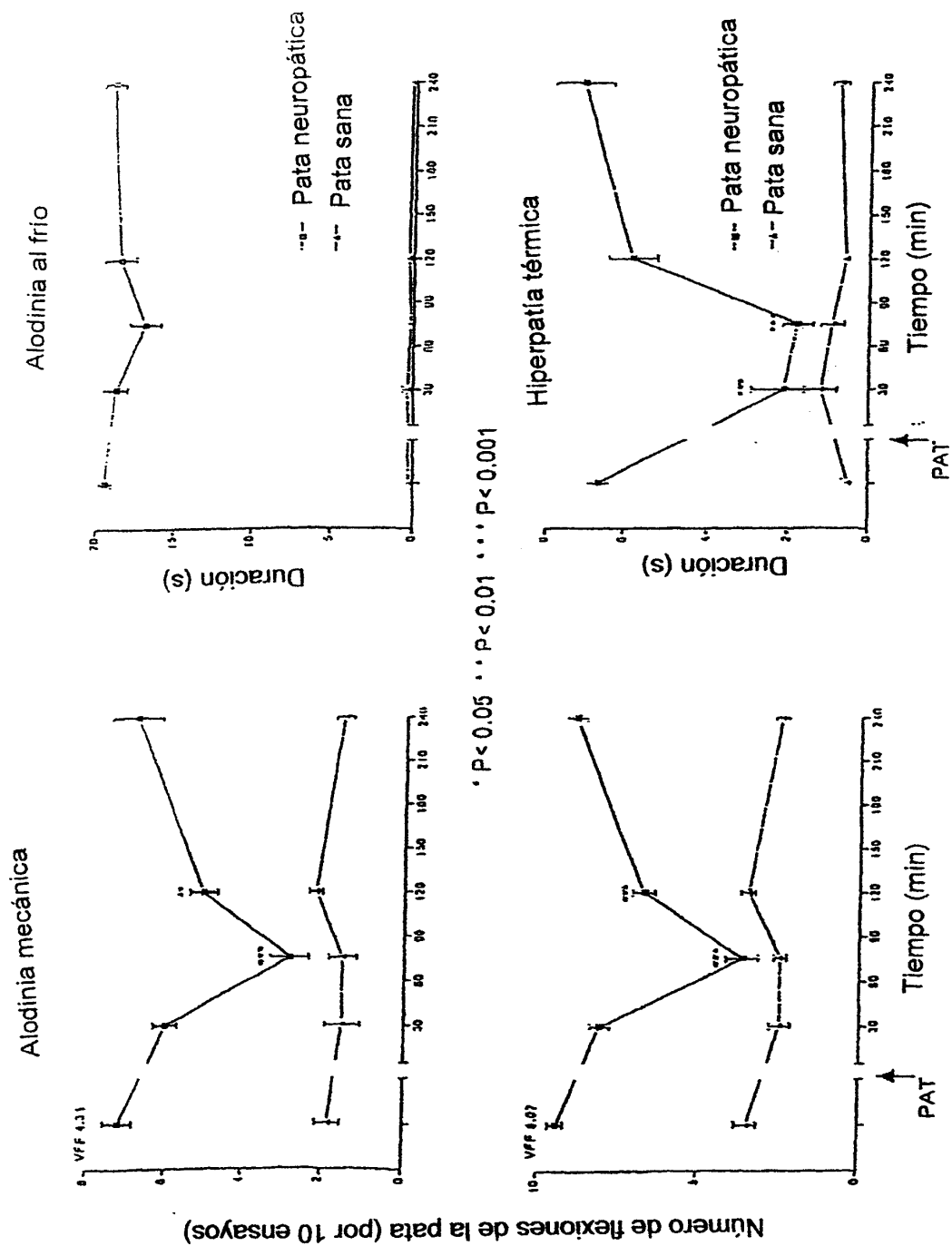
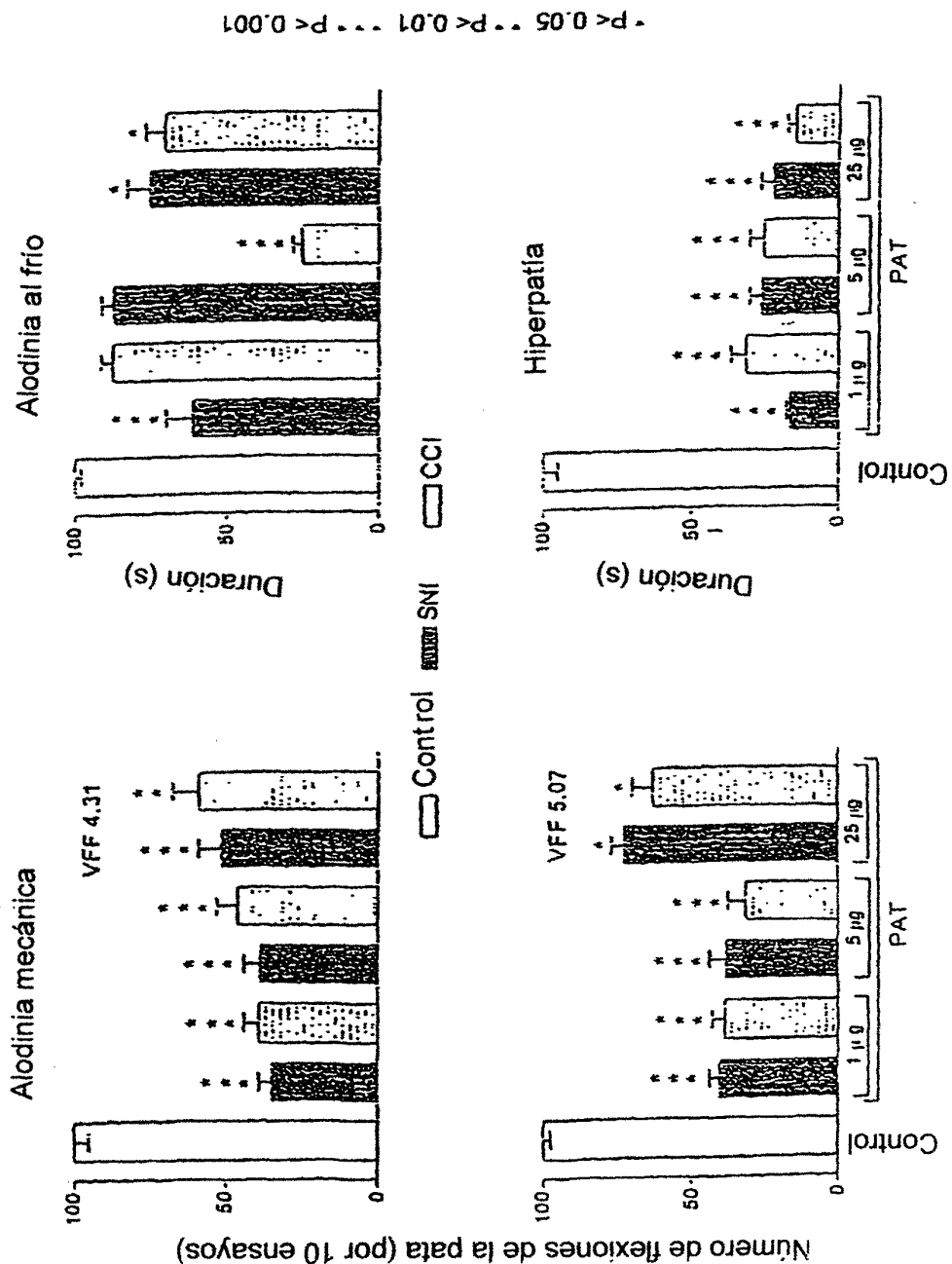


Figura 6

Figura 7



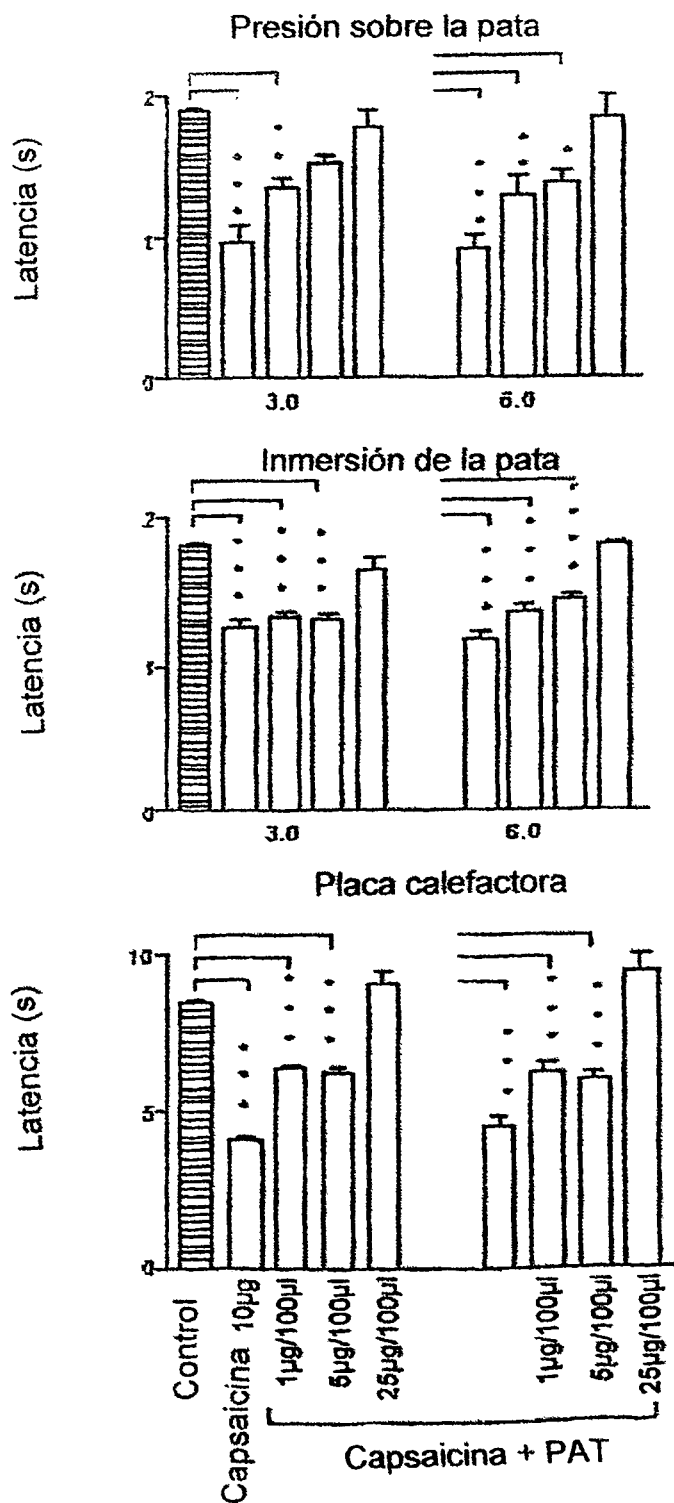


Figura 8

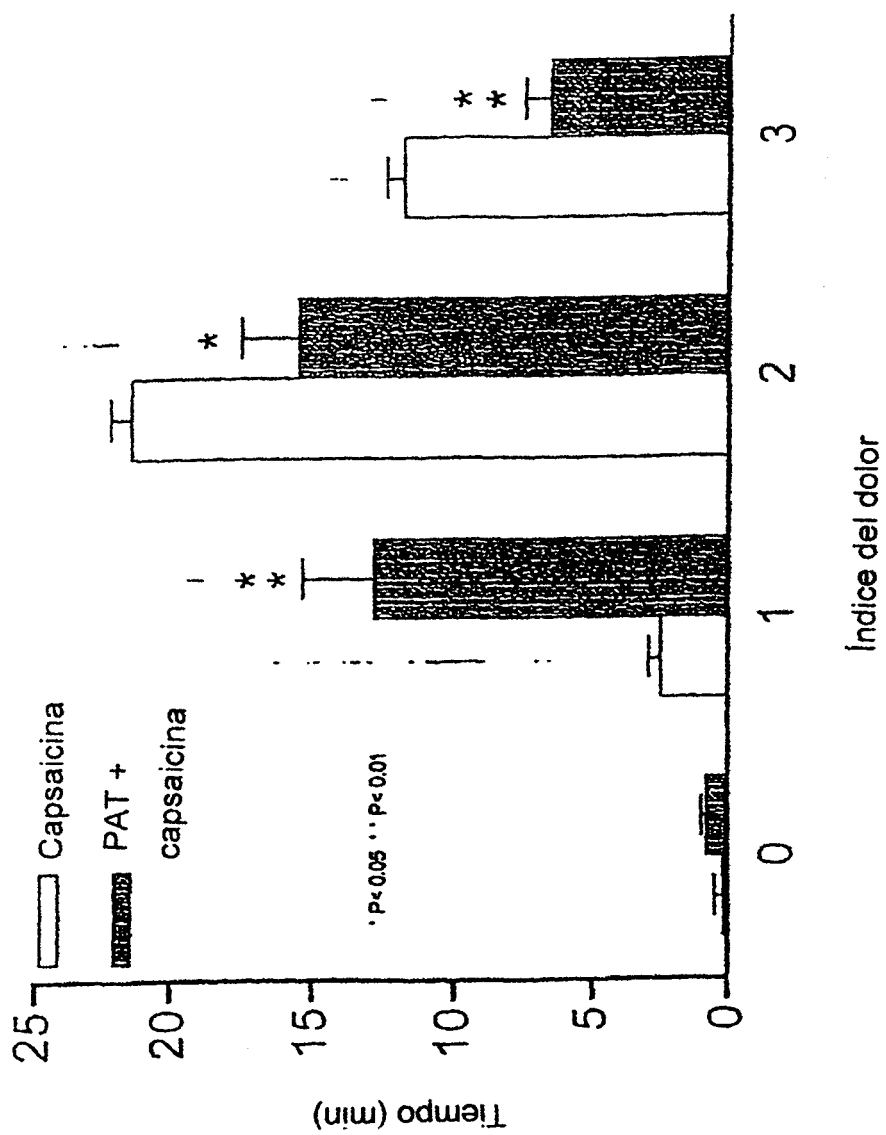


Figura 9

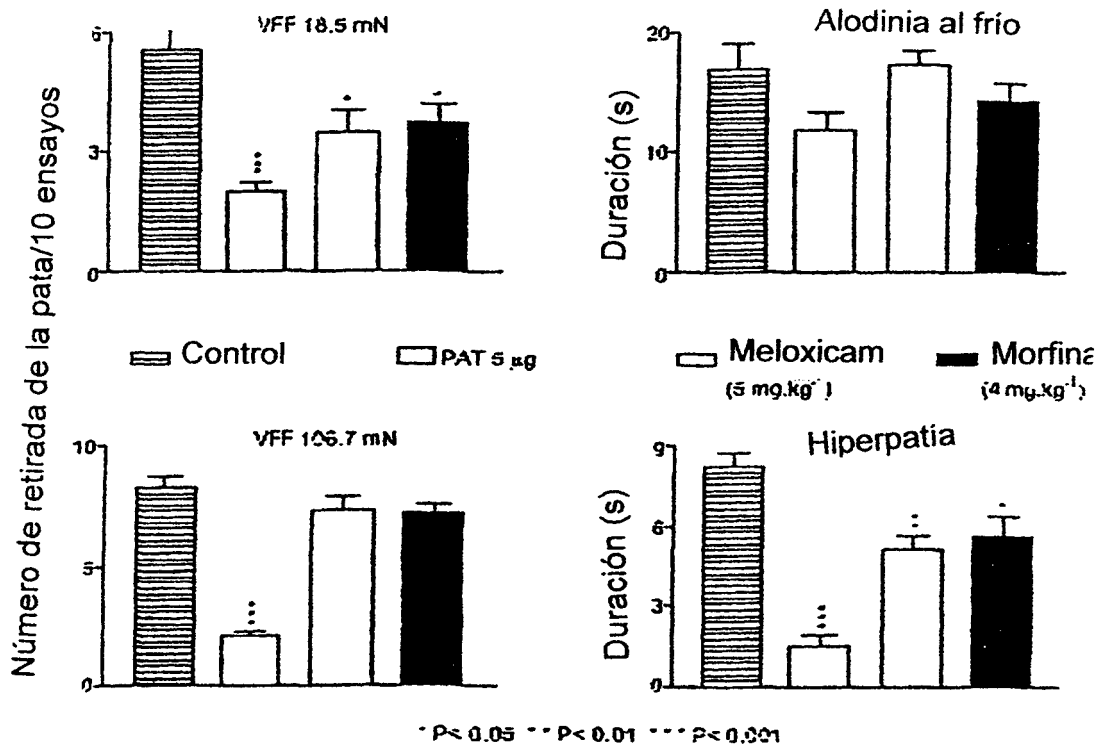


Figura 10

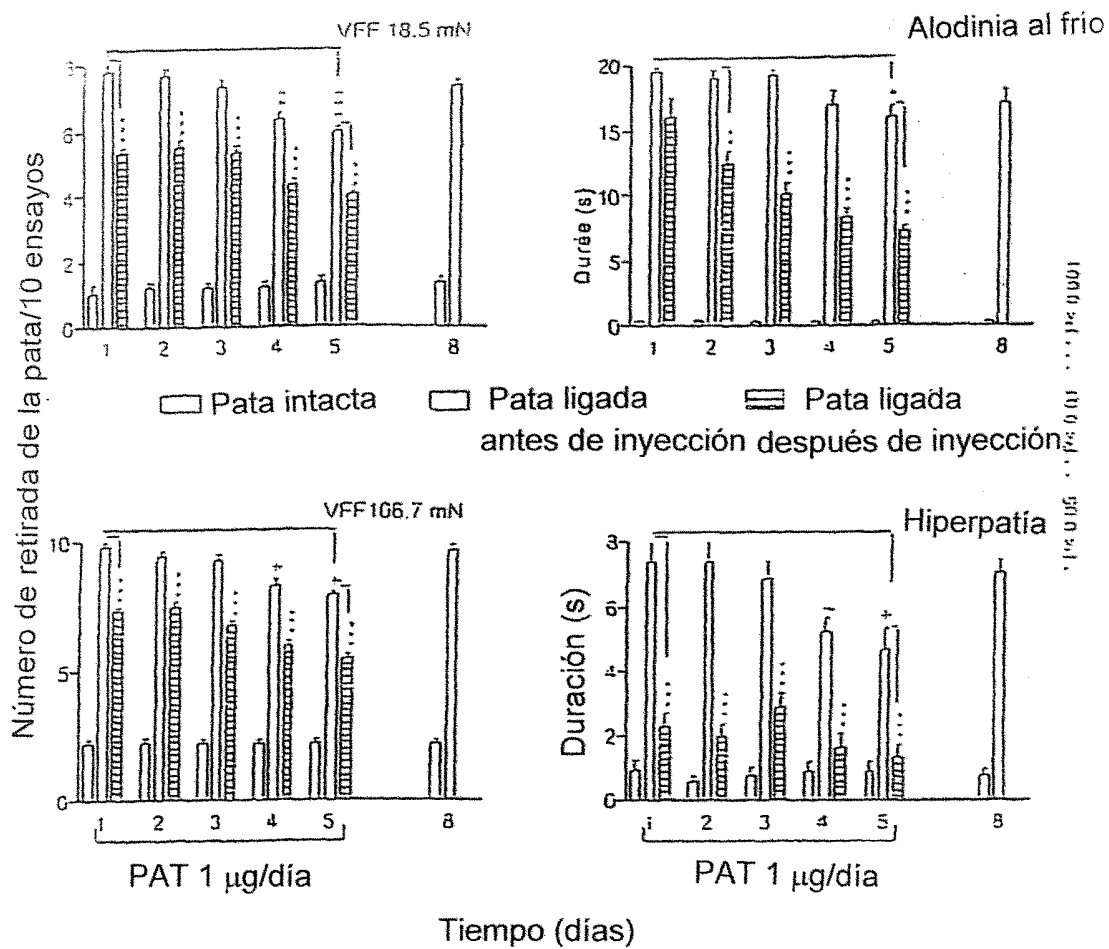


Figura 11