

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 043**

21 Número de solicitud: 202030468

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

A61P 31/16 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.05.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

23.11.2021

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓN PARA EL FOMENTO DE LA
INVESTIGACIÓN SANITARIA Y BIOMÉDICA DE
LA COMUNITAT VALENCIANA (FISABIO)**
(100.0%)

**Avda. Catalunya, 21
46020 Valencia (Valencia) ES**

72 Inventor/es:

**MIRA OBRADOR, Alejandro;
FERRER GARCÍA, María de los Desamparados;
CORELL ESCUIN, Paula y
LÓPEZ LABRADOR, Francisco Javier**

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

Observaciones:

La lista de secuencias está accesible al público en la página web de la OEPM para su descarga en formato electrónico.

54 Título: **PÉPTIDO PARA USO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD CAUSADA POR UN VIRUS QUE AFECTA A LAS VÍAS RESPIRATORIAS**

57 Resumen:

Péptido para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias.

Se describen péptidos y composiciones farmacéuticas que los comprenden, para uso en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, y en particular por un virus de la gripe. Adicionalmente, se describe un método y un kit para determinar in vitro la resistencia de un individuo a ser infectado por un virus que afecta a las vías respiratorias, determinando el nivel de dichos péptidos en la saliva de dicho individuo.

ES 2 880 043 A1

DESCRIPCIÓN

PÉPTIDO PARA USO EN LA PREVENCIÓN Y/O TRATAMIENTO DE UNA ENFERMEDAD CAUSADA POR UN VIRUS QUE AFECTA A LAS VÍAS RESPIRATORIAS**CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCION**

5 La presente invención se refiere a un péptido para uso en la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, y en particular, por un virus de la gripe. Adicionalmente, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* para detectar péptidos con actividad antiviral y, en particular, péptidos activos contra el virus de la gripe, en muestras de saliva. Finalmente, la presente invención también se refiere a un método *in vitro* para determinar el nivel de resistencia de un individuo a desarrollar síntomas de una enfermedad vírica de las vías respiratorias y, más en particular, síntomas de una enfermedad causada el virus de la gripe y a sufrir, por consiguiente, una afección o un proceso gripal.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los virus y, en concreto, el virus de la gripe o virus influenza, son una causa importante de enfermedades respiratorias, causando epidemias anuales e incluso pandemias, con un impacto severo en la salud pública, motivo de cientos de miles a millones de defunciones en todo el mundo. De todos los diferentes tipos y subtipos de virus de la gripe, los A(H1N1), A(H3N2) y B son los más comunes que infectan a los seres humanos, siendo los dos primeros asociados a mayor morbilidad.

Debido a la carga de la enfermedad asociada a los virus y, en concreto, al virus de la gripe, se han desarrollado varias estrategias para combatir este agente infeccioso. En los países desarrollados se han establecido campañas de vacunación anual frente a la gripe para las personas con mayor riesgo. Pero una vacuna elaborada un año puede no ser eficaz al año siguiente debido a las frecuentes y rápidas mutaciones (cambios en sus antígenos) que sufre el virus y a la dominancia variable de las diferentes cepas existentes en el propio virus de la gripe. Por otro lado, el tratamiento es únicamente sintomático y en los casos hospitalarios, suele ser de mantenimiento de constantes, reservándose los fármacos antivirales a los casos más graves (los más eficaces son los inhibidores de la neuraminidasa), aunque no carecen de toxicidad. Aunque hay estudios que demuestran que algunos antivirales, en particular el oseltamivir, pueden reducir la duración de la fase de replicación de los virus de la gripe y mejorar las perspectivas de supervivencia, aun no se ha encontrado un tratamiento altamente efectivo para estas enfermedades.

Por tanto, es necesario encontrar tratamientos contra las enfermedades víricas en general y, en particular, contra la gripe y otros virus que afectan las vías respiratorias. Además, es necesario establecer métodos eficaces para la detección de nuevos posibles tratamientos.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención describe un péptido, caracterizado porque comprende la secuencia SEC ID No.: 1, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

Adicionalmente, la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo a desarrollar síntomas de una enfermedad vírica de las vías respiratorias y, más en particular, síntomas del virus de la gripe y a sufrir, por consiguiente, una afección o un proceso gripal, donde dicho método comprende determinar la concentración total de péptidos de secuencias SEC ID No.: 4 y/o SEC ID No.: 5 en una muestra de saliva; de manera que cuanto mayor es la concentración de dichos péptidos en la muestra, mayor es la resistencia de dicho individuo contra una enfermedad vírica de las vías respiratorias y, más en particular, contra el virus de la gripe y a sufrir, por consiguiente, una afección o un proceso gripal.

La presente invención se refiere además a un kit para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo a desarrollar síntomas de una enfermedad vírica de las vías respiratorias y, más en particular, síntomas del virus de la gripe y a sufrir, por consiguiente, una afección o un proceso gripal, donde dicho kit comprende medios para determinar la concentración total de péptidos de secuencia SEC ID No.: 4 y/o SEC ID No.: 5 en una muestra de saliva.

Finalmente, la presente invención se refiere a un método para detectar *in vitro* péptidos con actividad frente a microorganismos infecciosos, en particular con actividad antiviral.

25 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Secuencia de la dermicidina esquematizada, indicando sus dominios de señal (S) con 19 aminoácidos, el prodominio (P) con 43 aminoácidos, y el dominio AMP (AMP), con 48 aminoácidos.

Figura 2. Representación esquemática de los resultados del Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HAI). Todos los pocillos contienen glóbulos rojos de pavo al 5% v/v (RBC), que equivale a 4×10^7 células/ml en tampón fosfato salino (PBS). Diluciones seriadas de péptido de secuencia SEC ID No.: 5 en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA -

Unidades de HemoAgglutinación-/50µl (fila A) y virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl (fila C). Diluciones seriadas del péptido EB (SEQ ID No.: 18) como control positivo en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl (fila B) y virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl (fila D). Las columnas de 1 a 10 incluyen cada una respectivamente: 4 mg/ml (columna 1), 2 mg/ml (columna 2), 1 mg/ml (columna 3), 0,5 mg/ml (columna 4), 0,25 mg/ml (columna 5), 0,125 mg/ml (columna 6), 0,06 mg/ml (columna 7), 0,03 mg/ml (columna 8), 0,015 mg/ml (columna 9) y 8 ng/ml (columna 10), del péptido correspondiente. Las columnas 11 y 12 incluyeron los siguientes controles: A11 y A12 contienen RBC en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl; B11 y B12 contienen 4 mg/ml del péptido de SEC ID No.: 5 y RBC; C11 y C12 contienen virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl y RBC; D11 y D12 contienen 4 mg/ml del péptido EB y RBC; y E11 y E12 contienen solamente PBS en presencia de RBC.

Figura 3. Representación esquemática del Ensayo de Inhibición de la Hemaglutinación (HAI). Todos los pocillos contienen glóbulos rojos de pavo al 5% v/v (RBC), que equivale a 4×10^7 células/ml en tampón fosfato salino (PBS). Cada fila corresponde a un péptido diferente: péptido de secuencia SEC ID No.: 5 (fila A), péptido de secuencia SEC ID No.: 14 (fila B), péptido de secuencia SEC ID No.: 3 (fila C), péptido de secuencia SEC ID No.: 10 (fila D), péptido de secuencia SEC ID No.: 2 (fila E), péptido de secuencia SEC ID No.: 13 (fila F) y péptido de secuencia SEC ID No.: 1 (fila G) todos ellos enfrentados contra el virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl. Las columnas de 1 a 10 incluyen cada una respectivamente: 4 mg/ml (columna 1), 2 mg/ml (columna 2), 1 mg/ml (columna 3), 0,5 mg/ml (columna 4), 0,25 mg/ml (columna 5), 0,125 mg/ml (columna 6), 0,06 mg/ml (columna 7), 0,03 mg/ml (columna 8), 0,015 mg/ml (columna 9) y 8 ng/ml (columna 10), del péptido correspondiente; exceptuando la fila G en la que la diluciones del péptido utilizado fueron: 8mg/ml (columna 1), 4 mg/ml (columna 2), 2 mg/ml (columna 3), 1 mg/ml (columna 4), 0,5 mg/ml (columna 5), 0,25 mg/ml (columna 6), 0,125 mg/ml (columna 7), 0,06 mg/ml (columna 8), 0,03 mg/ml (columna 9) y 0,015 mg/ml (columna 10) Las columnas 11 y 12 incluyeron los controles correspondientes al péptido de cada fila a una concentración de 4 mg/ml y RBC; exceptuando la fila G que su control contiene el péptido a 8 mg/ml y RBC. H1 y H2 contienen un control en el que se incluye el virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl y RBC, mientras que H3 y H4 contienen solamente PBS y RBC.

Figura 4. Concentración de péptidos de secuencias SEC ID No.: 4 (DCD) y SEQ ID No.: 5 (DCD-1L) en ng/ml en muestras de saliva procedentes de la glándula parótida ("Parotida"),

glándula sublingual y submandibular ("SL") y saliva total ("Total") no estimulada de 6 personas sanas. La diferencia de concentración secretada por la glándula parótida ("Parotida") respecto al resto es estadísticamente significativa (p -valor $< 0,5$). Las medidas se tomaron por test de inmunoensayo (ELISA), de acuerdo con el método del ejemplo 3.

5

Figura 5. Media y Error Standard de medidas de concentración total de péptidos de secuencias SEC ID No.: 4 (DCD) y SEQ ID No.: 5 (DCD-1L), expresada en ng/ml en muestras de saliva de individuos resistentes a la infección del virus de la gripe (Res, $n=36$) y de individuos ingresados por patología de las vías respiratorias y positivos al virus de la gripe por test de PCR, 6 meses después de la infección (Gripe-post, $n=17$), p -valor $< 0,05$. Las medidas se realizaron por test de inmunoensayo (ELISA), de acuerdo con el método del ejemplo 3.

Figura 6. Niveles de péptidos de secuencias SEC ID No.: 4 (DCD) y SEQ ID No.: 5 (DCD-1L), en ng/ml (**6A**) y ng/ μ g proteína salival total (**6B**) en muestras de saliva de personas con gripe en el momento de ingresar en el hospital (Gripe, $n=31$) y 6 meses después de haber sufrido los síntomas de la enfermedad (Gripe-post, $n=17$). La diferencia es estadísticamente significativa (figura 6A p -valor $< 0,001$, figura 6B p -valor $< 0,5$). Las medidas se obtuvieron por test de inmunoensayo (ELISA), de acuerdo con el método del ejemplo 3.

Figura 7. Concentración de péptidos de secuencias SEC ID No.: 4 (DCD) y SEQ ID No.: 5 (DCD-1L) en ng/ml en muestras de saliva de 4 voluntarios tomadas a diferentes tiempos a lo largo de un día (9, 12, 15, 18 y 21 horas). Las medidas se tomaron por test de inmunoensayo (ELISA), de acuerdo con el método del ejemplo 3.

Figura 8. Análisis de citotoxicidad mediante un ensayo de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) de los péptidos de la invención. Se muestra el % de viabilidad celular (eje Y) después de 20 horas de contacto con el péptido respectivo, frente a la concentración de los péptidos de SEC ID No.: 2 (LEK-45), SEC ID No.: 3 (SSL-45), SEC ID No.: 5 (DCD-1L) y frente al péptido EB como control positivo de inhibición de la hemaglutinación, en mg/ml (eje X). Media y Error Estándar del porcentaje de viabilidad celular de cada uno de los péptidos testados a diferentes concentraciones haciendo dos réplicas.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere, por tanto, a un péptido, caracterizado porque comprende una secuencia SEC ID No.: 1, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe, en el que el péptido de SEC ID No.: 1 es un fragmento derivado de la proteína humana dermicidina. La dermicidina es una proteína de origen humano que, una vez secretada, es procesada para dar lugar a diferentes péptidos de diferente actividad biológica. La secuencia de la dermicidina, esquematizada en la figura 1, consta de 110 aminoácidos de los cuales, comenzando por el extremo N-terminal, los primeros 19 aminoácidos corresponden al péptido señal, los siguientes 43 aminoácidos conforman el prodominio y los siguientes 48 aminoácidos son denominados el dominio antimicrobiano o AMP. Dicha denominación AMP se debe a que el estado de la técnica ha descrito efectos antimicrobianos derivados de péptidos con dicha secuencia (DE2001129983). A efectos de la presente invención, la secuencia de la dermicidina (isoforma 1, NCBI Reference Sequence: NP_444513.1) es la SEC ID No.: 17.

Por otro lado, a efectos de la presente invención, se denominan péptidos derivados de la dermicidina, aquellos péptidos que comprenden un fragmento de la secuencia SEC ID No.: 17 de la dermicidina. Las secuencias aminoacídicas de dichos fragmentos se recogen en la tabla 1:

LEK-42	SEC ID No.: 1	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHDKDV LD
LEK-45	SEC ID No.: 2	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHDKDV LDSVL
SSL-45	SEC ID No.: 3	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLD
DCD	SEC ID No.: 4	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLD
DCD-1L	SEC ID No.: 5	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLD
SSL-46	SEC ID No.: 6	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLD
LEK-44	SEC ID No.: 7	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHDKDV LDSV
LEK-43	SEC ID No.: 8	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHDKDV LDS
SSL-29	SEC ID No.: 9	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDL
SSL-25	SEC ID No.: 10	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA
LEK-41	SEC ID No.: 11	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHDKDV L
LEK-26	SEC ID No.: 12	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDL
LEK-24	SEC ID No.: 13	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVE
YDP-42	SEC ID No.: 14	YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP GLARQAPKPR KQ
Y-P30	SEC ID No.: 15	YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP
PIF	SEC ID No.: 16	YDPEAASAPG SGNPCHEAS A
Dermicidina (NCBI Ref. Seq.: NP_444513.1)	SEC ID No.: 17	MRFMTLLFLT ALAGALVCAY DPEAASAPGS GNPCHEASAA QKENAGEDPG LARQAPKPRK QRSSLLEKGL DGAKKAVGGL GKLKDAVED LESVGKGAVH DVKDVLD

Tabla 1. Péptidos derivados de la dermicidina

La presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 1, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. Además, la presente invención, también se refiere a un péptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17 para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe, dado que las secuencias 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17 comprenden el fragmento de la dermicidina con secuencia SEC ID No.: 1. Preferentemente, la invención se refiere a un

péptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 4 y SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

La dermicidina se creía presente solamente en tejidos tales como sudor, placenta, sangre o leche humana. En la presente invención se detecta por primera vez dermicidina en saliva humana, tal como se describe en el ejemplo 1.

Así, un aspecto de la invención se refiere, por tanto, a un método *in vitro* para detectar un péptido con actividad frente a microorganismos infecciosos, en particular con actividad frente a una patología viral, donde dicho método comprende:

- extraer y cuantificar *in vitro* el ADN de al menos una muestra de un donante resistente a dicho microorganismo infeccioso;
- elaborar al menos una genoteca a partir de dicho ADN extraído;
- expresar los genes clonados de cada genoteca;
- procesar las proteínas y péptidos expresados para adaptarlos al método de cribado a utilizar posteriormente;
- realizar un cribado de las proteínas y péptidos expresados para determinar cuáles presentan actividad frente a dicho microorganismo infeccioso.

De manera general, el cribado será seleccionado en función del tipo de microorganismo o tipo de patología. Dicho microorganismo se selecciona de entre un virus, una bacteria o un hongo. De manera preferente dicho microorganismo es un virus.

Más preferentemente, el virus se selecciona, sin limitación, entre el grupo que consiste en: un virus de la gripe o influenza virus; un coronavirus, tal como el SARS, MERS o SARS-COV-2; un virus sincitial (VRS); un rinovirus (RVs); un parainfluenza virus (PIV); un adenovirus (ADV), y un enterovirus, tal como el ENV-D68.

En una realización de la presente invención, dicho cribado comprende identificar una o más proteínas, o uno o más péptidos, que interactúan o bloquean una proteína del virus que inicia el reconocimiento celular o adhesión celular y que, por lo tanto, inicia la infección.

En una realización preferente dicho cribado comprende utilizar técnicas *in vitro* de inmunoensayo (ELISA), en donde se detecta la unión o interacción entre la proteína del virus y una o más proteínas o uno o más péptidos expresados.

Alternativamente, en otra realización preferente dicho cribado comprende utilizar un ensayo *in vitro* que detecta si se produce la adhesión del virus a una célula en presencia de alguna de las proteínas y péptidos expresados.

En una realización del método de la invención la muestra es una muestra de mucosa oral.

5 Preferentemente dicho microorganismo es un virus de la gripe o influenza virus. Los virus de la gripe se fijan mediante proteínas de superficie, hemaglutininas, a los azúcares de ácido siálico de la membrana de las células epiteliales mucosas de las fosas nasales, garganta y pulmones, siendo éste el primer paso de infección que resulta en la endocitosis del virus al interior celular.

10 En una realización del método de la invención, el cribado de las proteínas o péptidos expresados se realiza mediante la evaluación de la actividad de cada proteína o péptido expresado, utilizando un test de inhibición de hemaglutinación.

La técnica de la Inhibición de la Hemaglutinación (HAI) se basa en la capacidad de los virus de la gripe para aglutinar los glóbulos rojos debido a la proteína viral hemaglutinina (HA). Dado
15 que la HA participa en el primer paso del ciclo de infección de los virus de la gripe, esta técnica ha permitido identificar péptidos, para uso de acuerdo con la presente invención, que interfieren con el virus de la gripe al comienzo del ciclo de infección.

Así, tal como se observa en el ejemplo 2 y figuras 2 y 3 del presente documento, los péptidos de la invención bloquean la unión entre la hemaglutinina del virus (HA) y el ácido siálico de la
20 célula, inhibiendo la etapa de adhesión y, por lo tanto, la primera etapa de la infección.

Es por ello que una realización de la presente invención se refiere a un método para detectar un péptido para uso la prevención y/o tratamiento de la gripe que comprende:

- extraer y cuantificar ADN de al menos una muestra de mucosa orofaríngea *in vitro*;
- elaborar al menos una genoteca a partir de dicho ADN extraído;
- 25 ● expresar los genes clonados de cada genoteca;
- procesar las proteínas expresadas separándolas en diferentes fracciones en función de su peso molecular;
- realizar un cribado de las proteínas y péptidos expresados mediante la evaluación de la inhibición de hemaglutinación en presencia de dichas proteínas y péptidos.

En otra realización de la presente invención dicho microorganismo es un coronavirus y el cribado comprende evaluar la adhesión a la proteína de la espícula (S) del coronavirus de una célula en presencia de las proteínas y péptidos expresados.

Por tanto, una realización de la presente invención se refiere a un método para detectar un péptido para la prevención y/o tratamiento de una infección por coronavirus que comprende:

- extraer y cuantificar ADN de al menos una muestra de mucosa orofaríngea *in vitro*;
- elaborar al menos una genoteca a partir de dicho ADN extraído;
- expresar los genes clonados de cada genoteca;
- procesar las proteínas expresadas separándolas en diferentes fracciones en función de su peso molecular;
- realizar un cribado de las proteínas y péptidos expresados mediante la evaluación de la adhesión a la proteína de la espícula (S) del coronavirus de una célula en presencia de dichas proteínas y péptidos.

A efectos de la presente invención, el término “comprende” indica que incluye un grupo de características, pero no excluye la presencia de otras características, siempre y cuando la presencia de las otras características no haga la reivindicación impracticable. Además, los términos “consta de”, “contiene”, “incluye”, “tiene”, “abarca” y sinónimos de dichos términos, deben ser interpretados de la misma manera que el término “comprende”.

Adicionalmente, a efectos de la presente invención, el término “comprende” puede ser reemplazado por cualquiera de los términos “consta de”, “consiste en”, “consisten sustancialmente de” o “consisten sustancialmente en”. Así, cuando el término “comprende” se refiere a un grupo de características técnicas A, B y C, debe interpretarse que puede incluir adicionalmente otras características técnicas además de las características técnicas A, B y C, siempre y cuando la presencia de las otras características no haga la reivindicación impracticable, pero también puede interpretarse como que solamente comprende dichas características A, B y C o, sustancialmente dichas características A, B y C y, por tanto, el término “comprende” referido a un grupo que comprende las características A, B y C debe interpretarse que incluye un grupo que consiste de las características A, B y C, o que consiste sustancialmente de las características A, B y C.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 1 (LEK-42), para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una realización, dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 1.

En una realización, la invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consisten en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17. En otra realización preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5.

- 5 En otra realización, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 2 (LEK-45), para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una realización, dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2.

Preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 3 (SSL-45), para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una
10 realización, dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3.

Más preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 4 (DCD), para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

En una realización aún más preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

- 15 En una realización aún más preferente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 5 (DCD-1L), para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

En una realización aún más preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe.

- 20 La secuencia SEC ID No.: 5 es la secuencia del dominio AMP de la isoforma 1 de la proteína humana dermicidina (ver figura 1).

En otra realización preferente, la invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 17. Más preferentemente, la invención se refiere a un péptido que consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 17 que es la secuencia de la dermicidina humana
25 descrita anteriormente (isoforma 1, NCBI Reference Sequence: NP_444513.1).

La presente invención también se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 1 (LEK-42), para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

- 30 En una realización, la invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consisten en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las

vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En otra realización preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

En otra realización, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 2 (LEK-45), para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización, dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2.

Preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 3 (SSL-45), para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización, dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3.

Más preferentemente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 4 (DCD), para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

En una realización aún más preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

En una realización aún más preferente, la presente invención se refiere a un péptido que comprende una secuencia SEC ID No.: 5 (DCD-1L), para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

En una realización aún más preferente, la invención se refiere a un péptido que consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe.

De manera adicional, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque comprende una secuencia

seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o cualquier combinación de dichos péptidos, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque comprende una secuencia SEC ID No.: 1, o comprende una secuencia SEC ID No.: 2, preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 3, más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 4 y, aún más preferentemente, comprende una secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o cualquier combinación de dichos péptidos, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 1, o consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2, preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3, más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4, y aún más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de la gripe. En una realización también preferente el péptido comprende o consiste en una secuencia SEC ID No.: 17.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o cualquier combinación de dichos péptidos, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque comprende una secuencia SEC ID No.: 1, o comprende una secuencia SEC ID No.: 2, preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 3, más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 4 y, aún más preferentemente, comprende una secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o cualquier combinación de dichos péptidos, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a

las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 1, o consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2, preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3, más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4, y aún más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización también preferente el péptido comprende o consiste en una secuencia SEC ID No.: 17.

- 10 Una realización también de la presente invención se refiere al uso de al menos un péptido, o de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o cualquier combinación de los mismos, donde dicho péptido comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus
- 15 que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización preferente dicho péptido comprende una secuencia SEC ID No.: 1, o comprende una secuencia SEC ID No.: 2, preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 3, más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 4, y aún más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 5. Otra realización de la presente invención se refiere
- 20 al uso de al menos un péptido, o de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido o cualquier combinación de los mismos, donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 1, o consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2, más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3, aún más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4 y, aún más preferentemente, consiste en la
- 25 propia secuencia SEC ID No.: 5, para la elaboración de un medicamento para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe. En una realización también preferente de la invención se refiere al uso de al menos un péptido, o de una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido, en el que dicho el péptido comprende o consiste en la
- 30 secuencia SEC ID No.: 17.

Otra realización de la invención se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe, que comprende la administración de una cantidad efectiva de al menos un péptido que comprende una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en

SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o de una composición farmacéutica que comprende al menos uno de dichos péptidos o cualquier combinación de los mismos, a un sujeto que lo necesita. Más preferentemente dicho péptido comprende una secuencia SEC ID No.: 1, o comprende una secuencia SEC ID No.: 2, más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 3, aún más preferentemente comprende una secuencia SEC ID No.: 4 y, aún más preferentemente, comprende una secuencia SEC ID No.: 5. Otra realización preferente se refiere a un método para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, en particular causada por el virus de la gripe, que comprende la administración de una cantidad efectiva de al menos un péptido que consiste en una secuencia seleccionada de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17, o de una composición farmacéutica que comprende al menos uno de dichos péptidos o cualquier combinación de los mismos, a un sujeto que lo necesita. Preferentemente dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 1, o consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 2, más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 3, aún más preferentemente consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4 y, aún más preferentemente, consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5. En una realización también preferente el péptido comprende o consiste en una secuencia SEC ID No.: 17.

En otra realización preferente de la invención, el péptido es una variante artificial de una de las secuencias seleccionadas de entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 17. A efectos de la presente invención, se define variante artificial del péptido, a un péptido que tiene una secuencia en la que al menos un aminoácido es diferente al aminoácido presente en la secuencia inicial, porque dicho aminoácido ha sido remplazado o modificado artificialmente. De hecho, los péptidos de la presente invención proceden del procesado artificial de proteínas en fragmentos con una actividad citotóxica frente a virus, seleccionada ex profeso.

Se entiende como cantidad efectiva, a efectos de la presente invención, a aquella que proporciona un efecto terapéutico sin proporcionar efectos tóxicos inaceptables en el paciente. La cantidad o dosis efectiva del medicamento depende del compuesto y de la condición o enfermedad tratada y de, por ejemplo, la edad, peso y estado clínico del paciente tratado, la forma de administración, el historial clínico del paciente, la gravedad de la enfermedad y la potencia del compuesto administrado.

En una realización preferente el péptido comprende o consiste en la secuencia SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 o 5, o cualquier combinación de dichos péptidos, y la enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias es, en particular causada por el virus de la gripe y dicho virus comprende el subtipo H1N1.

- 5 En una realización más preferente el péptido comprende o consiste en la secuencia SEC ID No.: 4 o la SEC ID No.: 5 y la enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias es, en particular causada por el virus de la gripe y dicho virus comprende el subtipo H1N1 o el subtipo H3N2.

Las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, junto con los
10 péptidos descritos en la presente invención, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede ser, entre otros, un vehículo o diluyente. Opcionalmente, las composiciones para uso de acuerdo con la presente invención incluyen, junto con los péptidos descritos en la presente invención y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, al menos un segundo ingrediente activo o, al menos, un coadyuvante.

- 15 Dichas composiciones pueden presentarse en formas farmacéuticas tales como: cápsulas, comprimidos, saquitos o sobres o cualquier otro tipo de presentación. En particular dichas composiciones pueden presentarse de manera preferente en aerosoles, enjuagues bucales, geles, sistemas lipídicos de adhesión a mucosas y toallitas para las manos.

Para elaborar dichas composiciones, se puede utilizar técnicas convencionales para la
20 preparación de composiciones farmacéuticas. Por ejemplo, el compuesto de interés puede ser mezclado con un vehículo o diluido en un vehículo o contenido en un vehículo en forma de ampolla, cápsula, comprimido, sobre, saquito u otro recipiente y, en particular, en aerosoles, enjuagues bucales, geles acuosos o hidroalcohólicos y en toallitas húmedas. Cuando el vehículo sirve como disolvente, puede ser sólido, semi-sólido o líquido y actuar
25 como excipiente o medio para dicho péptido. El péptido de interés puede ser adsorbido en un medio granular sólido. Algunos ejemplos de vehículos adecuados son agua, soluciones salinas, alcoholes, polietilenglicoles, aceite de ricino polihidroxietoxilado, aceite de cacahuete, aceite de oliva, lactosa, terra alba, sacarosa, ciclodextrinas, amilosa, estearato de magnesio, talco, gelatina, agar, pectina, acacia, ácido esteárico, éteres de alquilo de celulosa, ácido
30 silicio, ácidos grasos, aminos de ácidos grasos, monoglicéridos y diglicéridos de ácidos grasos, ésteres grasos de pentaeritrol, polietileno, hidroximetilcelulosa y polivinilpirrolidona. Asimismo, el vehículo o soporte puede incluir materiales de liberación sostenida conocidos en el estado de la técnica, tales como gliceril monoestearato o diesterato solo o mezclado con

una cera. Las formulaciones pueden también incluir agentes humectantes, emulsificadores, agentes de suspensión, preservantes, edulcorantes o saborizantes. Las composiciones pueden ser formuladas para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada del agente activo después de que sea administrada al paciente empleando métodos conocidos en el estado de la técnica.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser esterilizadas y mezcladas, si así se desea, con agentes adicionales, emulsificantes, sal para influenciar la presión osmótica, tampones y/o sustancias colorantes que no reaccionan de manera adversa con los compuestos activos.

Una realización de la presente invención se refiere también al modo de administración, que puede ser cualquier modo que transporte de manera efectiva el péptido de interés al lugar deseado de acción, tales como modos de administración oral, rectal o parenteral, por ejemplo, tópica, subcutánea, intravenosa, intrauretral, intramuscular, intranasal o como solución oftálmica. En particular, las composiciones pueden ser administradas preferentemente mediante contacto cutáneo, como en jabones, geles acuosos o hidroalcohólicos, o en toallitas húmedas. Además, preferentemente las composiciones pueden ser administradas por vía nasal, u oral, en aerosoles o enjuagues bucales.

Los péptidos de la invención también pueden ser formulados en nanopartículas, liposomas, nanoemulsiones, esterificados o conjugados con un grupo de polietilenglicol, en matrices poliméricas, o formulados de manera que se mejore su biodisponibilidad, junto con otros aminoácidos, quitosano o ácidos grasos.

Para administración oral, se pueden preparar tanto formas de dosificación sólidas como líquidas. Para preparar composiciones sólidas como comprimidos, el péptido de interés se puede mezclar en una formulación con otros ingredientes convencionales tales como talco, estearato de magnesio, fosfato bicálcico, silicato de aluminio y magnesio, almidón, lactosa, acacia, metilcelulosa y materiales similares funcionalmente tales como vehículos y diluyentes farmacéuticos.

Las cápsulas pueden ser preparadas mezclando el péptido de interés con un disolvente inerte farmacéuticamente y rellenando la mezcla en una gelatina dura de tamaño apropiado. Cápsulas blandas se preparan con máquinas de encapsulación de suspensiones del compuesto de interés con un aceite vegetal, una parafina ligera o un aceite inerte aceptables. Pueden ser preparadas también, formas de dosificación líquidas tales como jarabes, elixires y suspensiones. Las formas solubles en agua pueden ser disueltas en un vehículo acuoso junto con azúcar, aromas saborizantes y conservantes para formar un jarabe. Un elixir es

preparado usando un vehículo hidroalcohólico (p.ej. etanol) con edulcorantes adecuados tales como azúcar o sacarina, junto con agentes aromáticos saborizantes. Las suspensiones pueden ser preparadas con un vehículo acuoso y la ayuda de un agente de suspensión tal como acacia, tragacanto, metilcelulosa y similares.

- 5 Para aplicación parenteral son evidentes para el experto en la materia, el uso de soluciones o suspensiones inyectables, para uso intradermal, intramuscular, intravascular y subcutáneo.

Además del compuesto de interés las composiciones pueden incluir otros diluyentes y excipientes no tóxicos farmacéuticamente aceptables, incluyendo vehículos de utilización común en composiciones farmacéuticas de uso habitual en humanos o animales, así como
10 sistemas lipídicos que ayuden a la retención en mucosas para su liberación continuada. El diluyente se selecciona de manera que no afecte a la actividad biológica de la composición.

Ejemplos de diluyentes usados especialmente en formulaciones inyectables son soluciones salinas orgánicas e inorgánicas, solución de Ringer, solución de dextrosa y solución de Hank. Además, las composiciones pueden incluir aditivos como otros excipientes, agentes
15 adyuvantes, estabilizadores no terapéuticos y no inmunogénicos y similares.

Ejemplos de excipientes que pueden incluirse en la formulación incluyen, pero no se limitan a codisolventes, tensioactivos, aceites, humectantes, emolientes, conservantes, estabilizantes y antioxidantes. Se puede utilizar cualquier tampón fisiológicamente aceptable, tal como Tris o tampones de fosfato. Cantidades efectivas de diluyentes o aditivos o excipientes son
20 aquellas que son efectivas para obtener una formulación farmacéuticamente aceptable en términos de solubilidad y actividad biológica.

Otra realización de la invención se refiere al régimen de dosificación. El término dosis unitaria se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para un individuo, en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de material activo calculada
25 para producir el efecto terapéutico adecuado en asociación con el diluyente, soporte o vehículo adecuado.

Adicionalmente la presente invención se refiere a un método para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo a ser infectado con un virus que afecta a las vías respiratorias, donde dicho método comprende determinar la concentración total de péptidos de secuencia
30 SEC ID No.: 4 y/o 5 en una muestra de saliva; en donde cuanto mayor es la concentración de dichos péptidos en la muestra, mayor es la resistencia de dicho individuo a ser infectado con dicho virus.

Tal como se muestra en el ejemplo 3, el método desarrollado detecta de manera cualitativa y cuantitativa la dermicidina en una muestra de saliva de manera indolora, no invasiva y sencilla.

Además, tal como se muestra en la figura 7, los niveles de DCD (SEC ID No.: 4) y DCD-1L (SEC ID No.: 5) medidos no varían de forma significativa a lo largo del día. Ello sugiere que la concentración de DCD y DCD-1L en saliva no es dependiente del ritmo circadiano, por lo que el momento del día en el que se tome la muestra no influiría en su determinación. Esto facilita el uso del método para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo a ser infectado con un virus que afecte a las vías respiratorias, de acuerdo con la presente invención, pues las medidas podrían tomarse por la mañana o por la tarde, adaptándose a los horarios de las clínicas o centros de salud.

A efectos de la presente invención los términos “virus que afectan las vías respiratorias”, “virus respiratorio”, “enfermedades víricas de las vías respiratorias”, o similares, se refieren a enfermedades que presentan síntomas adversos en las vías respiratorias y son producidas por un virus. Preferentemente, dicho virus que afecta las vías respiratorias se selecciona, sin limitación, entre el grupo que consiste en: un virus de la gripe o influenza virus; un coronavirus, tal como el SARS, MERS o SARS-COV-2; un virus sincitial (VRS); un rinovirus (RVs); un parainfluenza virus (PIV); un adenovirus (ADV), y un enterovirus, tal como el ENV-D68. En una realización preferente el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe. Más preferentemente el virus de la gripe comprende un subtipo H1N1 y/o un subtipo H3N2.

Por otro lado, tal como se recoge en la figura 6, la producción de DCD (SEC ID No.: 4) y DCD-1L (SEC ID No.: 5) es significativamente mayor en personas infectadas con, en este caso, el virus de la gripe durante la infección por gripe respecto a sus niveles basales en ausencia de infección. Esto demuestra que la producción de estos péptidos se estimula en respuesta a la infección por un virus respiratorio, en esta caso la gripe, y es, por tanto, una muestra de su utilidad en la prevención y/o tratamiento de dicha enfermedad, tal como se protege en la presente invención.

Otra realización de la presente invención se refiere a un kit para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo a ser infectado por un virus que afecta a las vías respiratorias, donde dicho kit comprende medios para analizar la concentración total de péptidos de secuencia SEC ID No.: 4 y 5 en una muestra de saliva. En una realización preferente el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe. Más preferentemente el virus de la gripe comprende un subtipo H1N1 y/o un subtipo H3N2.

A efectos de la presente invención, la muestra de saliva, utilizada en el método y kit de la invención, es una muestra *ex vivo*.

En una realización preferente, la concentración del péptido se determina mediante inmunoensayo. Más preferentemente, la concentración del péptido se determina utilizando anticuerpos específicos para dermicidina y el factor inductor de la proteólisis en humanos.

EJEMPLOS

Los ejemplos descritos a continuación tienen carácter ilustrativo y no pretenden limitar el ámbito de la presente invención.

10 Ejemplo 1: Método para la detección de péptidos con actividad antiviral

Este ejemplo permitió la identificación de la dermicidina como proteína humana que inhibe la hemaglutinación del virus de la gripe y que, por tanto, protege frente a la infección del virus de la gripe.

Toma y procesado de muestras

15 Se realizaron genotecas humanas en el fago lambda con el ADN de las muestras de mucosa oral y orofaríngea (Veterinary Microbiology, Vol. 76(4), 2000, 359-372). Para ello, tras la firma del consentimiento informado de cada voluntario se procedió a la toma de muestras: 1) una muestra de mucosa de la mejilla (M) frotando ambas mejillas suavemente con una torunda estéril; 2) una muestra de mucosa orofaríngea (OF) mediante el roce suave con una torunda sobre la zona de la orofaringe, y 3) una muestra de gárgaras (W), realizada durante 30 segundos con un volumen de 20 ml de suero fisiológico que posteriormente fue recogido. Cada una de las muestras de los 19 voluntarios se trasladaron al laboratorio en frío, donde se almacenaron a -20°C hasta su procesado para la elaboración de las genotecas.

Elaboración de las genotecas

25 Para la extracción del ADN de las 57 muestras (3 muestras de cada uno de los 19 voluntarios) se utilizó el kit Gentra Puregene Buccal Cell Kit específico para extraer ADN de células bucales. Tras cuantificar el ADN extraído con un espectrofotómetro con pedestal NanoDrop®, se seleccionaron aquellas muestras con mayor concentración para la elaboración de las genotecas. Seguidamente, este ADN se digirió parcialmente con la enzima de restricción Sau3A y se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión a 4° C durante toda una noche para observar claramente el patrón de bandas. Al día siguiente, se cortó la banda de ADN de tamaño adecuado de entre 9 y 10 Kb y se realizó el tratamiento con la enzima gelasa para

extraer el ADN del gel, siguiendo las recomendaciones del proveedor (Epicenter Tech). Por último, se concentró el ADN con las columnas Microcon YM-100 (Millipore).

Como vector para la construcción de las genotecas de ADN humano se utilizó el sistema ZAP Express® Predigested Vector Kit (Stratagene, La Jolla, CA), el cual proporciona el genoma parcial del fago lambda digerido con el enzima Bam H1. El proceso se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante (ligación del ADN humano parcialmente digerido con el vector de expresión, empaquetamiento en partículas fágicas, titulación de las genotecas y amplificación de las mismas).

En total, se realizaron 6 genotecas definitivas de entre 10.000 y 100.000 clones cada una.

10 Amplificación, filtrado y concentración

A continuación, se amplificaron las mezclas de fagos de cada genoteca individualmente con el objetivo de incrementar la cantidad de proteínas expresadas. Para ello, se incubó una alícuota de cada una de las mezclas de clones en sus respectivos fagos, con células XL1-Blue MRF de *E.coli* durante 15 minutos a 37 °C. Tras la infección, se plaquearon diluciones seriadas en placas de NZY Agar y se incubaron a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se recuperaron las proteínas expresadas junto con los fagos amplificados siguiendo el protocolo del kit ZAP Express Predigested Vector Kit and ZAP Express Predigested Gigapack Cloning Kits BamH I/CIA-P-Treated (Agilent Technologies). Tras recuperar las proteínas expresadas durante la infección, se agruparon en diferentes mezclas y se filtraron por filtros de 0.2 µm y por 100 KDa para eliminar restos celulares y los fagos respectivamente, y evitar una posible interferencia en el ensayo.

Finalmente, la muestra resultante se filtró con filtros de 2 kDa (Vivacon 2 2kDa centrifugal concentrators; 7500 x g, 99 minutos, 4 °C) con el doble objetivo de concentrar la solución y obtener, de manera separada todas las proteínas mayores y menores a 2 kDa, respectivamente, para realizar el cribado frente al virus de la gripe con ambas fracciones.

Cribado frente al virus de la gripe

Tras realizar los respectivos controles como titulación del antígeno estandarizado, detección de aglutininas no específicas en las mezclas de proteínas provenientes de los fagos con inserto y en los controles sin inserto, se realizaron los ensayos de la Inhibición de la Hemaglutinación (Inhibition of Hemagglutination assay, por sus siglas en inglés HAI) de cada una de las mezclas de cada genoteca siguiendo el manual de la OMS (WHO Global Influenza Surveillance Network, "Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of

influenza), como prueba de cribado para determinar su posible actividad frente a la infección del virus de la gripe.

La técnica HAI se basa en la capacidad de los virus de la gripe para aglutinar los glóbulos rojos debido a la proteína viral hemaglutinina (HA). Dado que la HA participa en el primer paso del ciclo de infección de los virus de la influenza, la técnica desarrollada permitió identificar péptidos humanos que interfieren con el virus de la gripe al comienzo del ciclo de infección.

Los ensayos de inhibición de la hemaglutinación se realizaron siguiendo el diagnóstico serológico de influenza mediante el protocolo de prueba de inhibición de la hemaglutinación de la OMS (WHO Global Influenza Surveillance Network (2011) Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza; <http://www.who.int/influenza/en/>).

Como resultado del cribado, se obtuvieron 4 muestras positivas de 2 individuos diferentes capaces de producir HAI.

Puesto que cada una de estas 4 muestras estaba compuesta por más de 200 clones distintos, para identificar la proteína responsable de la actividad HAI del resto, se llevaron a cabo diferentes estrategias.

Se analizó el extracto de proteínas derivadas de la genoteca con actividad frente al virus de la gripe mediante electroforesis en SDS-PAGE (gel de electroforesis de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio, por sus siglas en inglés Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) específico para visualizar proteínas de bajo peso molecular, y posterior tinción con el colorante Coomassie-blue. A continuación, se realizó el análisis de la huella peptídica del área del gel correspondiente al peso molecular entre 1 y 5 kDa.

Los resultados revelaron una mezcla de proteínas comprendidas entre 1 y 5 kDa, que tras el análisis adicional de LC-MS (cromatografía en fase líquida acoplada a un espectrómetro de masas, por sus siglas en inglés, Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy) permitió la obtención de las secuencias de aminoácidos de los diferentes péptidos de la mezcla. Dichas secuencias se compararon con la base de datos de proteínas humanas, resultando concordancias con 73 proteínas humanas.

De los 73 péptidos presentes en la muestra, tres correspondieron a dermicidina, un péptido con un peso molecular de 4,8 kDa. De esta manera se elaboró un método para detectar *in vitro*, péptidos biológicos, que son activos contra un virus que afecta a las vías respiratorias, y en concreto, en este caso, frente al virus de la gripe.

Ejemplo 2: Ensayos *in vitro* de actividad de la dermicidina frente al virus de la gripe

A continuación, con el objetivo de evaluar si la dermicidina, o un fragmento de la misma, es la responsable de la inhibición de la hemaglutinación provocada por el virus de la gripe, tanto en subtipos H1N1 como H3N2, y por tanto del bloqueo de la primera etapa de infección del virus.

- 5 Se sintetizaron diferentes fragmentos derivados de dermicidina, así como la dermicidina completa, para evaluar su actividad contra el virus de la gripe:

LEK-42	SEC ID No.: 1	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHVDVKDV LD
LEK-45	SEC ID No.: 2	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVEDLESVG KGAVHVDVKDV LDSVL
SSL-45	SEC ID No.: 3	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVL
DCD-1L	SEC ID No.: 5	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDAVEDLE SVGKGAVHDV KDVLDSVL
SSL-25	SEC ID No.: 10	SSLLEKGLDG AKKAVGGLGK LGKDA
LEK-24	SEC ID No.: 13	LEKGLDGAKK AVGGLGKLGK DAVE
YDP-42	SEC ID No.: 14	YDPEAASAPG SGNPCHEASA AQKENAGEDP GLARQAPKPR KQ
EB	SEC ID No.: 18	RRKKAALL PAVLLALLAP

Tabla 2. Péptidos sintetizados

- La síntesis de péptidos se basó en la técnica de síntesis en fase sólida, mediante la estrategia de protección con Fmoc desarrollada por Atherton y Sheppard (Atherton E, Sheppard RC. Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach. IRL Press; Oxford: 1989). En primer lugar, la cadena peptídica se unió covalentemente a una resina insoluble. A continuación, la desprotección del aminoácido acoplado a la superficie sólida, junto con la activación del grupo ácido carboxílico terminal del aminoácido añadido, condujo al acoplamiento del nuevo aminoácido. Mediante la repetición de este esquema de reacción se obtuvo el acoplamiento gradual de aminoácidos para conseguir la secuencia peptídica deseada. El péptido final se escindió de la superficie de resina mediante un ácido fuerte.

- Los ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (HAI, por sus siglas en inglés, Hemagglutination Inhibition assay) se realizaron siguiendo el diagnóstico serológico de influenza mediante el protocolo de prueba de inhibición de la hemaglutinación de la OMS

(WHO Global Influenza Surveillance Network (2011); Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza).

El péptido EB de SEC ID No.: 18, descrito por Jones *et al.* (Journal of Virology, Dec. 2006, p. 11960-11967, doi:10.1128/JVI.01678-06) se utilizó como control positivo.

- 5 Para los ensayos se utilizaron glóbulos rojos de pavo al 5% v/v (RBC), así como muestras de virus de la gripe, subtipos H1N1 y H3N2. Para estandarizar los virus se prepararon diferentes concentraciones de RCB (de 1% a 7%), se cuantificó el número de células con una cámara de Neubauer cada día y se procedió a la titulación de los antígenos para obtener una concentración de virus para los ensayos de 8 UHA/50µl (UHA=Unidades de Hemaglutinina)
- 10 estandarizadas para el subtipo H1N1 y 4 UHA/25µl para el subtipo H3N2.

En el primer ensayo (figura 2) se evaluó la eficacia de uno de los péptidos de la invención, ejemplificado por un péptido de secuencia aminoacídica SEC ID No.: 5 (DCD-1L) para inhibir la hemaglutinación del virus de la gripe de los subtipos H1N1 y H3N2, en glóbulos rojos de pavo al 5% v/v (RBC). Se evaluaron así diluciones seriadas de péptido de secuencia SEC ID

15 No.: 5 en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl y RBC (fila A) y virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl (fila C); además, se realizaron diluciones seriadas del péptido EB como control positivo de hemaglutinación en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl (fila B) y virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl (fila D). Las columnas de 1 a 10 incluyen cada una respectivamente: 4 mg/ml (columna 1), 2 mg/ml (columna 2), 1 mg/ml

20 (columna 3), 0,5 mg/ml (columna 4), 0,25 mg/ml (columna 5), 0,125 mg/ml (columna 6), 0,06 mg/ml (columna 7), 0,03 mg/ml (columna 8), 0,015 mg/ml (columna 9) y 8 ng/ml (columna 10), del péptido correspondiente. Las columnas 11 y 12 incluyeron los siguientes controles: A11 y A12 contienen RBC en presencia de virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl; B11 y B12 contienen 4 mg/ml del péptido de SEC ID No.: 5 y RBC; C11 y C12 contienen un control con

25 virus H3N2 estandarizado a 4 UHA/25µl y RBC; D11 y D12 contienen 4 mg/ml del péptido EB y RBC; y E11 y E12 contienen solamente PBS en presencia de RBC. Tal como se puede observar en dicha figura 2, el péptido de SEC ID No.: 5 es activo tanto frente al subtipo H1N1 como frente al subtipo H3N2, inhibiendo la hemaglutinación.

En un segundo ensayo (figura 3) se evaluó la actividad de varios péptidos derivados de dermicidina frente al subtipo H1N1 mediante ensayos de Inhibición de la Hemaglutinación (HAI). Se llevaron a cabo, por tanto, diluciones seriadas de: péptido de secuencia SEC ID No.: 5 (fila A), péptido de secuencia SEC ID No.: 14 (fila B), péptido de secuencia SEC ID No.: 3 (fila C), péptido de secuencia SEC ID No.: 10 (fila D), péptido de secuencia SEC ID No.: 2 (fila

30

E), péptido de secuencia SEC ID No.: 13 (fila F) y péptido de secuencia SEC ID No.: 1 (fila G), todos contra el subtipo H1N1 del virus de la gripe estandarizado a 8 UHA/50µl. Las columnas de 1 a 10 incluyen cada una respectivamente: 4 mg/ml (columna 1), 2 mg/ml (columna 2), 1 mg/ml (columna 3), 0,5 mg/ml (columna 4), 0,25 mg/ml (columna 5), 0,125 mg/ml (columna 6), 0,06 mg/ml (columna 7), 0,03 mg/ml (columna 8), 0,015 mg/ml (columna 9) y 8 ng/ml (columna 10), del péptido correspondiente exceptuando la fila G que sus diluciones seriadas fueron: 8 mg/ml (columna 1), 4 mg/ml (columna 2), 2 mg/ml (columna 3), 1 mg/ml (columna 4), 0,5 mg/ml (columna 5), 0,25 mg/ml (columna 6), 0,125 mg/ml (columna 7), 0,06 mg/ml (columna 8), 0,03 mg/ml (columna 9) y 0,015 mg/ml (columna 10). Todos ellos enfrentados contra el subtipo H1N1 del virus de la gripe estandarizado a 8 UHA/50µl. Las columnas 11 y 12 incluyeron los siguientes controles: A11 y A12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 5 y RBC, B11 y B12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 14 y RBC; C11 y C12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 3 y RBC; D11 y D12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 10 y RBC; E11 y E12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 2 y RBC; F11 y F12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 13 y RBC; G11 y G12 contienen 4 mg/ml del péptido de secuencia SEC ID No.: 1 y RBC; H1 y H2 contienen un control en el cual solamente se incluye el virus H1N1 estandarizado a 8 UHA/50µl y RBC, mientras que H3 y H4 contienen solamente PBS en presencia de RBC.

Tal como se puede observar en la figura 3, solamente los péptidos de SEC ID No: 1, 2, 3 y 5 tuvieron actividad frente al subtipo H1N1 del virus de la gripe.

Ejemplo 3: Método de cuantificación *in vitro* del contenido de dermicidina en muestras de saliva

Se modificó el protocolo recomendado por el kit de la empresa CUSABIO BIOTECH CO., LTD, Human Proteolysis Inducing Factor/Dermicidin (PIF/DCD) ELISA Kit (número de catálogo: CSB-E13626h) para detectar dermicidina en muestras de saliva humana. El kit original utilizado determina la concentración de dermicidina y del factor inductor de la proteólisis humana (PIF) en plasma, suero, sobrenadantes de cultivos celulares, orina y homogenizados de tejidos, pero no en saliva. A partir de dicho kit se ha desarrollado un método utilizando el susodicho kit que permitió detectar cuantificar la dermicidina también en muestras de saliva.

El método y kit de la invención utiliza un ensayo tipo sándwich que emplea anticuerpos específicos para (DCD;DCD-1L)/PIF que recubren los pocillos de ensayo.

El pre-procesado de las muestras de saliva humana para la detección de dermicidina es el siguiente: las muestras de saliva no estimulada, almacenadas a -80°C desde su recolección, se deben descongelar a 4 °C durante toda la noche para evitar que las proteínas se desnaturalicen por cambios bruscos de temperatura. Posteriormente, se centrifugan a 1000 x g durante 20 minutos a 4 °C para seguir manteniendo las muestras en frío y eliminar a su vez todos los restos celulares y de comida que puedan contener.

Las muestras de saliva se diluyeron entre 1:4 a 1:8 con el diluyente para muestras del kit (frente a la dilución 1:500 que recomienda el kit comercial, dado que la saliva tiene una concentración de células humanas, comida y bacterias importante), y el tiempo de incubación de la muestra con el sustrato fue modificado a un tiempo de entre 5 y 15 minutos (frente a los 15 a 30 minutos recomendados en el kit comercial).

Para validar los resultados de este método, se utilizaron tanto DCD-1L como PIF sintetizados químicamente a una concentración conocida (6 ng/ml) y una mezcla equimolar de ambos para demostrar que los valores detectados corresponden a los iniciales puestos en el pocillo. En la tabla 3 se muestran los resultados de esta prueba, demostrando que, bajo las condiciones optimizadas, el kit mide las concentraciones de forma apropiada:

	Concentración real (ng/ml)	OD1	OD2	Media	Corregido	Concentración calculada (ng/ml)
DCD-1L	6	0,2196	0,2395	0,2295	0,2084	7,85
PIF	6	0,1673	0,1283	0,1478	0,1266	5,05
DCD-1L + PIF	6	0,1663	0,1884	0,1773	0,1562	6,09

Tabla 3. Valores de absorbancia y de concentraciones reales de los péptidos sintetizados químicamente y aquellas calculadas por el kit. Las diferencias entre la concentración real y la calculada no son significativas (p-valor = 0,75) por lo que el valor obtenido por el método de detección diseñado reproduce la concentración real.

De esta manera se ha demostrado que la dermicidina es detectable en muestras de saliva humana.

Además, el método desarrollado detecta de manera cualitativa y cuantitativa la dermicidina en una muestra de saliva y presenta la ventaja del tipo de muestra que es indolora, no invasiva y fácil de conseguir.

Con este método se evaluó, también, la concentración de dermicidina, medida como concentración conjunta de péptidos DCD-1L y DCD, en muestras de saliva procedentes de la glándula parótida y de las glándulas sublingual y submandibular, así como en la saliva total no estimulada de 6 personas sanas. Tal como se recoge en la figura 4, los datos muestran

5 que la dermicidina se segrega principalmente en la glándula parótida. Por tanto, pacientes que tengan la función de esta glándula comprometida (por ej. pacientes con síndrome de Sjögren o tratados por radioterapia en cáncer de cabeza-cuello, entre otros) pueden ver disminuida su producción de dermicidina, con posibles consecuencias sobre la susceptibilidad a infección por un virus que afecta a las vías respiratorias.

10

Ejemplo 4: Método *in vitro* de determinación de la resistencia a un virus que afecta las vías respiratorias en un individuo

Con el método de detección de dermicidina en saliva desarrollado en el ejemplo 3 se procedió a desarrollar un método de detección *in vitro* de la resistencia de un individuo a ser infectado

15 por un virus que afecta las vías respiratorias, por ejemplo, y en concreto por el virus de la gripe.

Para ello, se recogieron muestras de saliva de dos grupos de individuos: (1) personas ingresadas que dieron positivo en infección por virus de la gripe; y (2) personas que nunca han padecido los síntomas de la enfermedad y no han sido vacunados nunca. Previo a la toma

20 de muestras se evaluó satisfactoriamente la toma de muestras, el uso y la evaluación de las mismas por el Comité de Ética de FISABIO-DGSP.

En la figura 5 se muestran los resultados de las medias y error estándar de la concentración conjunta de péptidos DCD y DCD-1L en saliva (ng/ml), utilizando el método del ejemplo 3, de los individuos pertenecientes a dos grupos de población (resistentes a la infección del virus

25 de la gripe (Res, n=36) e individuos sensibles a la infección, recontactados 6 meses después de haber estado ingresados por patología de las vías respiratorias positivos al virus de la (Gripe-post, n=17)).

Por otro lado, se realizó la medición del nivel de péptidos de dermicidina (detectando los niveles de DCD y DCD-1L), mediante test ELISA tal como se ha descrito anteriormente en el

30 ejemplo 3, en muestras de saliva de personas en el momento de ingresar en el hospital por gripe (n=31) y 6 meses después de haber sufrido los síntomas (n=17). Los datos, tal como se recogen en la figura 6, muestran que la producción de DCD y/o DCD-1L es significativamente mayor en personas infectadas con el virus de la gripe durante la infección por gripe respecto

a sus niveles basales en ausencia de infección. Así, en la figura 6A, se muestra los valores totales de péptidos DCD y DCD-1L, en ng/ml en muestras de saliva del grupo de individuos con gripe en el momento de ingresar en el hospital (Gripe, n=31) y a los 6 meses después de haber sufrido los síntomas de la enfermedad (Gripe-post, n=17), medidos con el método de la invención, de acuerdo con el ejemplo 3. Por otro lado, en la figura 6B, se muestra los valores totales de péptidos DCD y DCD-1L, en ng sobre los µg de proteína salival total para los mismos grupos. La tabla 4, a continuación, muestra los valores de significación estadística obtenidos para los datos de las figuras 5, 6A y 6B con el test Mann-Whitney:

Concentración total DCD y DCD-1L por ml de saliva					
Grupo	Test	n1	n2	p-valor	Significación
Individuos resistentes a la gripe frente a individuos sensibles después de 6 meses de la enfermedad (figura 5)	Mann-Whitney	36	17	0,0044	**
Individuos sensibles a la gripe- durante la enfermedad y después de 6 meses (figura 6A)	Mann-Whitney	31	17	0,0005	***
Individuos sensibles a la gripe- durante la enfermedad y después de 6 meses (figura 6B)	Mann-Whitney	32	19	0,0199	*

Tabla 4. Valores de significación estadística para las figuras 5, 6A y 6B

Esto demuestra que la producción del péptido se estimula en respuesta a la infección por gripe. Finalmente, se evaluó utilizando el mismo test ELISA descrito anteriormente en el ejemplo 3, si la concentración de péptidos de dermicidina (DCD y DCD-1L) en saliva varía a lo largo del día. Se tomaron muestras de saliva no estimulada de 4 voluntarios a las 9, 12, 15, 18 y 21 horas, al menos media hora después de haber ingerido comida. Tal como se muestra en la figura 7, los datos muestran que los niveles de DCD y DCD-1L no varían de forma significativa a lo largo del día. Ello sugiere que la concentración conjunta de DCD y DCD-1L en saliva no es dependiente del ritmo circadiano, por lo que el momento de la toma de muestras no influiría en su determinación. Esto facilita el uso del método de la invención, pues las medidas podrían tomarse por la mañana o por la tarde, adaptándose a los horarios de las clínicas o centros de salud.

Ejemplo 5: Ensayo de citotoxicidad

Se analizó la citotoxicidad de los péptidos de la invención, que presentan actividad antiviral mediante ensayos de citotoxicidad *in vitro* sobre el modelo de células eucariotas MDCK.

Se mandaron sintetizar químicamente 4 péptidos con actividad frente al virus de la gripe:

- 5 - DCD-1L (SEC ID No.: 5) de 48 aminoácidos
- SSL-45 (SEC ID No.: 3) de 45 aminoácidos
- LEK-45 (SEC ID No.: 2) de 45 aminoácidos
- EB de 20 aminoácidos utilizado como control

Para llevar a cabo el ensayo de citotoxicidad, se cultivaron las células MDCK en placas
 10 multipocillo a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células/ml y se hicieron diluciones seriadas de todos los péptidos a testar. Se incubaron las células junto con los péptidos durante 20 horas a 37°C 5% CO₂. Transcurrido ese tiempo, se añadió 20µl del reactivo MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) por pocillo. Dicho compuesto es reducido a un producto derivado de formazan por las células viables y
 15 metabólicamente activas. Este nuevo compuesto es detectado midiendo la absorbancia a 490 nm por un lector de placas transcurridas 2 horas de incubación. Todo ello se ha llevado a cabo en condiciones de esterilidad para evitar contaminaciones.

Las medidas de absorbancia se transformaron a porcentaje de viabilidad celular teniendo en
 20 cuenta como 100% de viabilidad las medidas de absorbancia de los controles (células incubadas solamente junto con el tampón y el compuesto MTS).

En la figura 8 se muestran los resultados de las medias y error estándar de los porcentajes de viabilidad celular de cada una de las concentraciones de los péptidos testados. Se puede observar que ninguno de los tres péptidos de interés testados, SEC ID No.: 5 (DCD1-L), SEC ID No.: 3 (SSL-45) y SEC ID No.: 2 (LEK-45) causan toxicidad significativa en las células.
 25 Incluso a la concentración más alta testada en este experimento (1 mg/ml) sólo produce una toxicidad celular del 20% de las células del cultivo. Mientras que el péptido utilizado como control (EB), a una concentración casi diez veces inferior (0,125 mg/ml) produce una citotoxicidad del 50% de las células del cultivo, y a 0,5 mg/ml del péptido EB se observa una destrucción celular total.

30 Los resultados demuestran que los péptidos con actividad frente al virus de la gripe no producen efectos citotóxicos significativos a las concentraciones efectivas. Este dato abre la vía para siguientes ensayos de efectividad de los péptidos.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que comprende la secuencia SEC ID No.: 1, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias.
5
2. Un péptido para uso, de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe.
3. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho péptido comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17.
10
4. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5.
15
5. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4 y/o en la propia secuencia SEC ID No.: 5.
20
6. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4.
7. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5.
25
8. Un péptido para uso, de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde cuando el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe y dicho virus de la gripe comprende el subtipo H3N2, el péptido usado comprende o consiste en la SEC ID No.: 4 o la SEC ID No.: 5.
30

9. Un péptido para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en donde cuando el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe y dicho virus de la gripe comprende el subtipo H1N1, el péptido usado se selecciona entre los péptidos que comprenden o consisten en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5.

5

10. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido caracterizado porque comprende una secuencia SEC ID No.: 1; y al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable, para uso en la prevención y/o tratamiento de una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias.

10

11. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe.

12. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, en donde dicho péptido comprende una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 y 17, o cualquier combinación de péptidos que comprendan alguna de las susodichas secuencias.

13. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5, o cualquier combinación de péptidos que consistan en alguna de las susodichas secuencias.

14. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4 y/o en la propia secuencia SEC ID No.: 5.

15. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 4.

16. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en donde dicho péptido consiste en la propia secuencia SEC ID No.: 5.
- 5 17. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde cuando el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe y dicho virus de la gripe comprende el subtipo H3N2, el péptido usado comprende o consiste en la SEC ID No.: 4 o la SEC ID No.: 5.
- 10 18. Una composición farmacéutica para uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, en donde cuando el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe y dicho virus de la gripe comprende el subtipo H1N1, el péptido usado se selecciona entre los péptidos que comprenden o consisten en SEC ID No.: 1, 2, 3, 4 y 5.
- 15 19. Método para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo contra una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, donde dicho método determina la concentración conjunta de péptidos que consisten en una secuencia SEC ID No.: 4 y en una secuencia SEC ID No.: 5, en una muestra de saliva;
20 en donde cuanto mayor es la concentración de dichos péptidos en la muestra, mayor es la resistencia de dicho individuo a padecer dicha enfermedad.
- 20 20. Método de acuerdo con la reivindicación 19, en donde el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe.
- 25 21. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 19 o 20, en el que la determinación de la concentración del péptido se realiza mediante inmunoensayo.
- 30 22. Método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 20 o 21, en el que la determinación de la concentración del péptido se realiza utilizando anticuerpos específicos para dermicidina y el factor inductor de la proteólisis en humanos.

23. Kit para determinar *in vitro* el nivel de resistencia de un individuo contra una enfermedad causada por un virus que afecta a las vías respiratorias, donde dicho kit comprende medios para analizar la concentración conjunta de péptidos que consisten en una secuencia SEC ID No.: 4 y en una secuencia SEC ID No.: 5, en una muestra de saliva de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22.
24. Kit de acuerdo con la reivindicación 23, en donde el virus que afecta a las vías respiratorias es un virus de la gripe.
25. Método *in vitro* para detectar un péptido con actividad frente a una patología viral, donde dicho método comprende:
- extraer y cuantificar *in vitro* el ADN de al menos una muestra de un donante resistente a dicha patología viral;
 - elaborar al menos una genoteca a partir de dicho ADN extraído;
 - expresar los genes clonados de cada genoteca;
 - procesar las proteínas y péptidos expresados para adaptarlos al método de cribado a utilizar posteriormente;
 - realizar un cribado de las proteínas y péptidos expresados para determinar cuáles presentan actividad frente a un virus causante de dicha patología viral.
26. Método de acuerdo con la reivindicación 25, en el que la patología viral es la gripe y en donde el cribado de dichas proteínas y péptidos expresados comprende evaluar la actividad de cada proteína o péptido expresado, utilizando un test de inhibición de hemaglutinación.

FIGURA 1



FIGURA 2

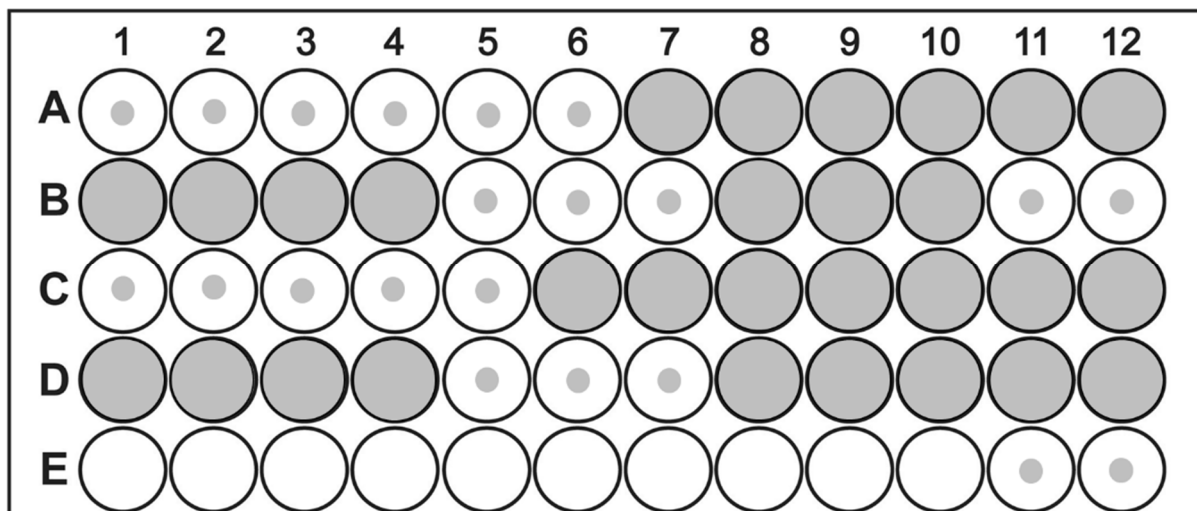


FIGURA 3

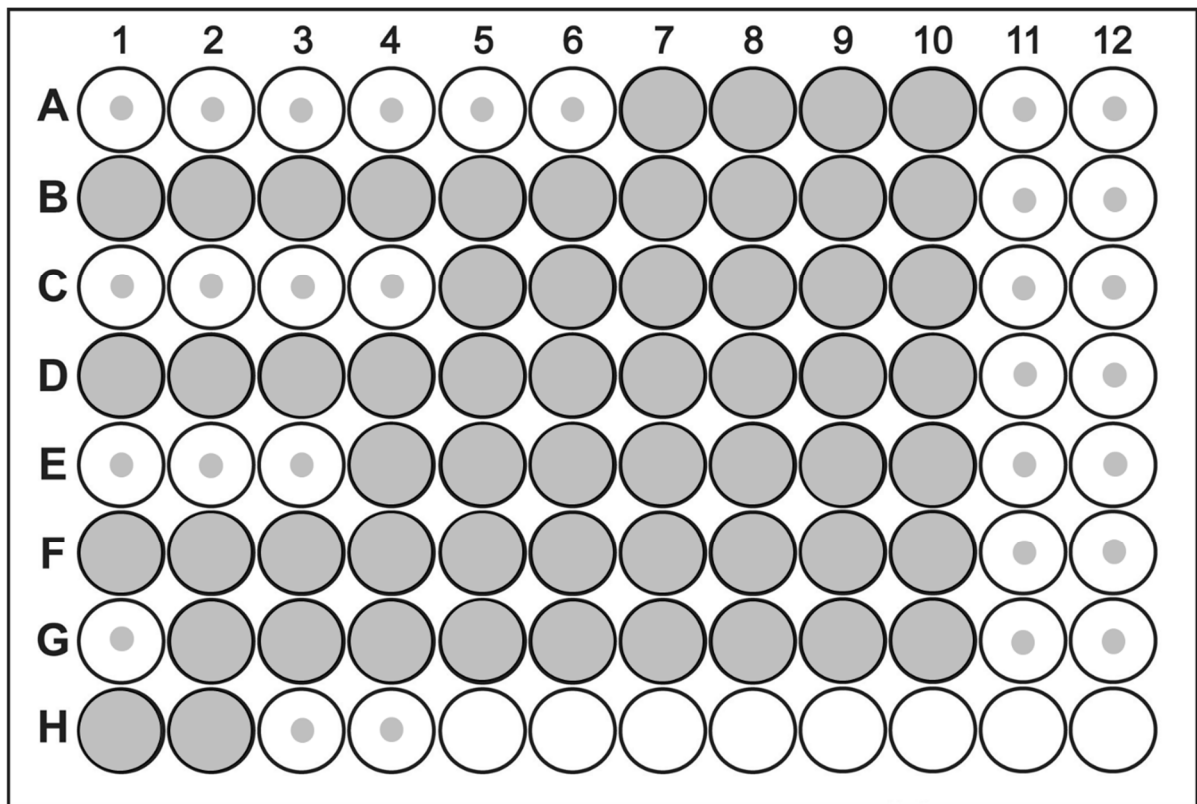


FIGURA 4

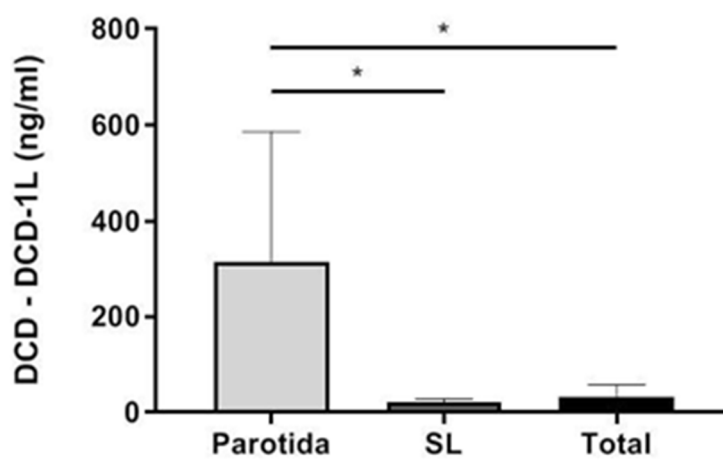


FIGURA 5

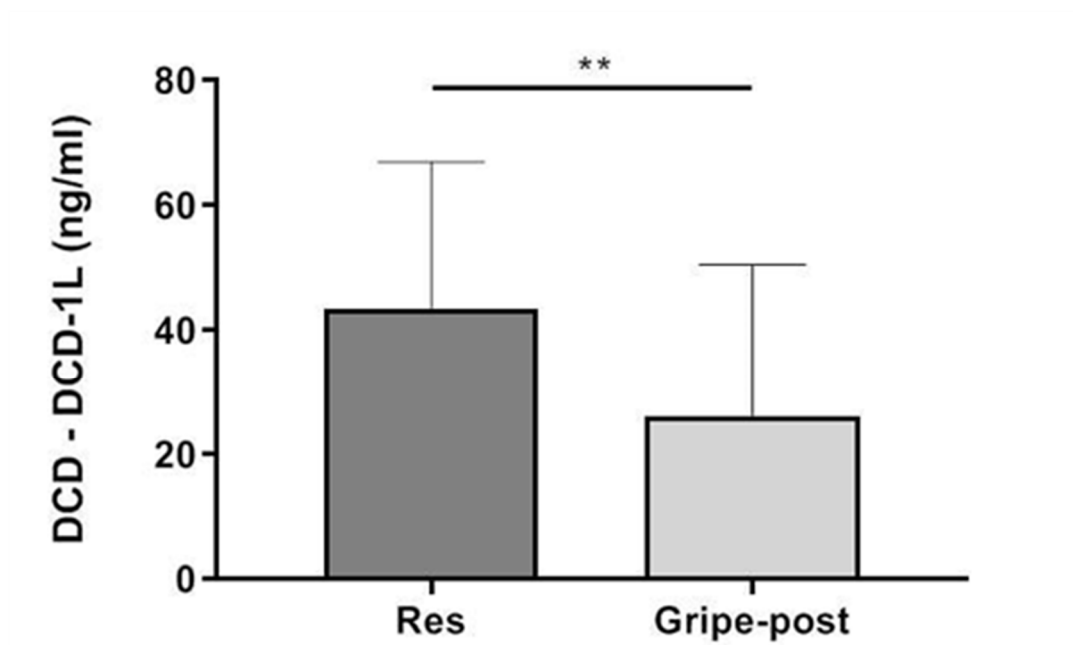
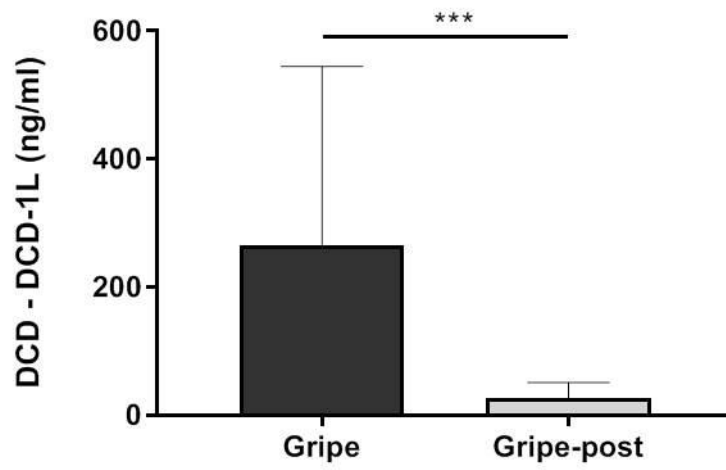


FIGURA 6

A



B

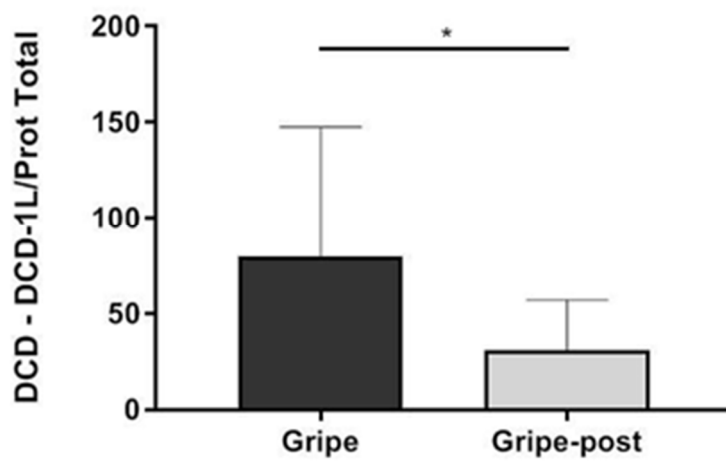


FIGURA 7

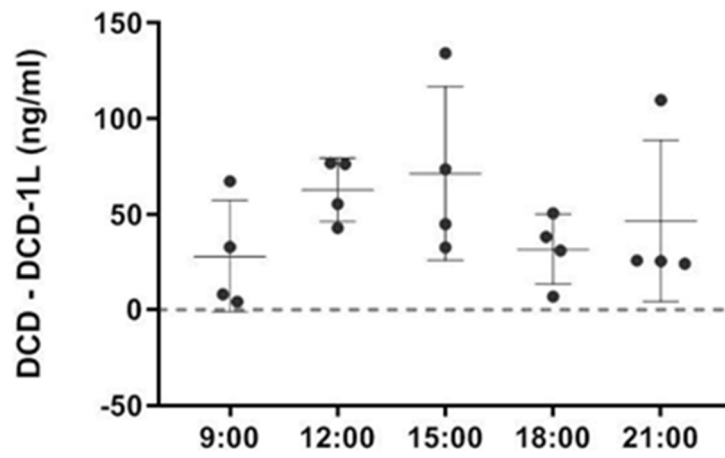
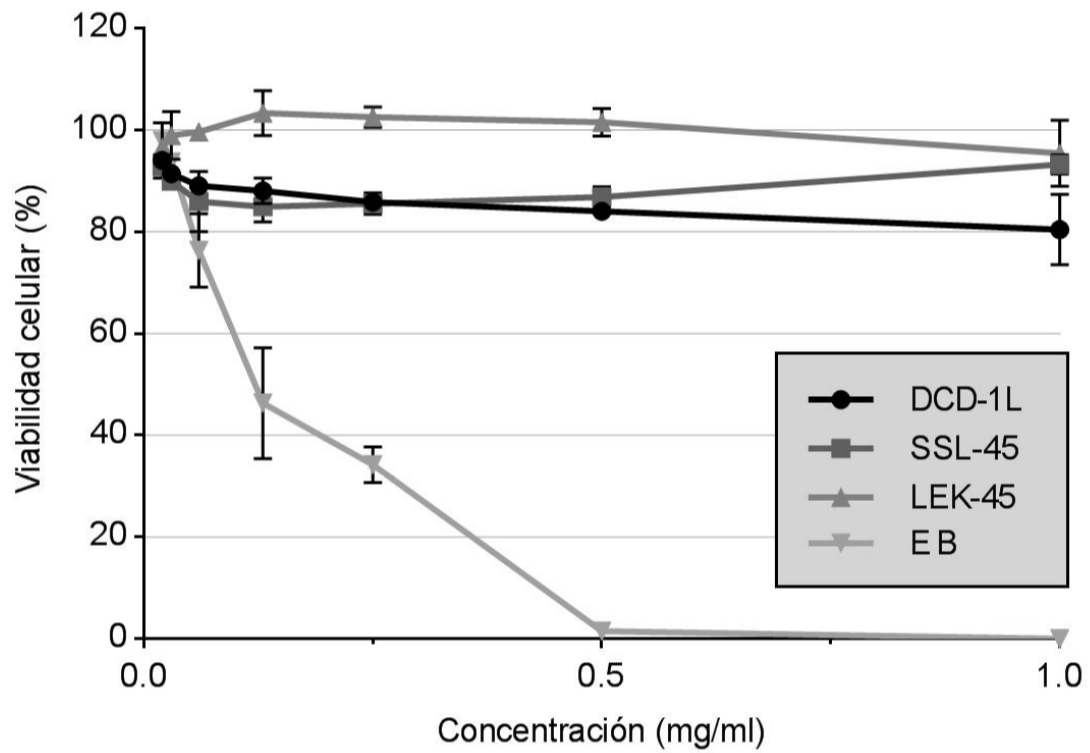


FIGURA 8





②① N.º solicitud: 202030468

②② Fecha de presentación de la solicitud: 20.05.2020

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	SCHITTEK, B. The multiple facets of dermcidin in cell survival and host defense. Journal of Innate Immunity. Junio 2012, Vol. 4, Nº 4, páginas 349 - 360. ISSN 1662-811X (impreso), ISSN 1662-8128 (electrónico), <DOI: 10.1159/000336844>. Especialmente: página 351, columna derecha - página 352, columna izquierda; página 355, columna derecha; página. 357; figura 1; figura 2b.	1-18
A	US 8329865 B2 (GARBE,C. et al) 11/12/2012, Ejemplo 4; ejemplo 5; columna 15, línea 40 - columna 16, línea 21; SEQ ID NO: 1, 2, 3, 10, 55, 56, 97.	1-18
A	BURIAN, M. et al. The secrets of dermcidin action. International Journal of Medical Microbiology. Febrero 2015, Vol. 305, Nº 2, páginas 283 - 286. ISSN 1438-4221 (impreso), ISSN 1618-0607 (electrónico), <DOI: 10.1016/j.ijmm.2014.12.012>. Todo el documento.	1-18
A	COOMBS, K. M. et al. Quantitative proteomic analyses of influenza virus-infected cultured human lung cells. Journal of Virology. Octubre 2010, Vol. 84, Nº 20, páginas 10888-10906. ISSN 0022-538X (impreso), ISSN 1098-5514 (electrónico), <DOI:10.1128/JVI.00431-10>. Especialmente: tabla 2; página 10904, segundo párrafo.	1-18
A	BURKE, T. W. et al. Nasopharyngeal protein biomarkers of acute respiratory virus infection. EBioMedicine. Marzo 2017, Vol. 17, páginas 172 - 181. ISSN 2352-3964 (electrónico), <DOI:10.1016/j.ebiom.2017.02.015>. Especialmente: tabla 2; tabla 3; apartado "Discussion".	1-18
A	TSUCHIDA, S. et al. Detection of ubiquitinated dermcidin in gingival crevicular fluid in periodontal disease. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. Junio 2016, Vol. 22, Nº 2, páginas 249-253. ISSN 1573-3149 (impreso), ISSN 1573-3904 (electrónico), <DOI: 10.1007/s10989-015-9504-6>. Especialmente apartado "Introduction".	1-18

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

☐ para todas las reivindicaciones

☒ para las reivindicaciones nº: 1-18

Fecha de realización del informe
04.03.2021

Examinador
E. Relaño Reyes

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

A61K38/17 (2006.01)

C07K14/47 (2006.01)

A61P31/16 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A61K, C07K, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, XPESP, INSPEC, COMPDX, NPL, XPOAC, DBAASP, CAMP, ADAM, REGISTRY, HCAPLUS, NRPL1, UNIPARC