



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 307 534**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/575** (2006.01)

**C12N 15/16** (2006.01)

**C12N 15/10** (2006.01)

**C12N 15/67** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 38/22** (2006.01)

**A61P 3/08** (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **00967002 .7**

(96) Fecha de presentación : **27.09.2000**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1192182**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **03.04.2002**

(54) Título: **Agonistas de receptores 3(R3) del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) y sus métodos de uso farmacológicos.**

(30) Prioridad: **28.09.1999 US 407832**  
**15.06.2000 US 595280**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.12.2008**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.12.2008**

(73) Titular/es: **BAYER CORPORATION**  
**800 Dwight Way**  
**Berkeley, California 94701-1986, US**

(72) Inventor/es: **Pan, Clark;**  
**Tsutsumi, Manami y**  
**Shanafelt, Armen, B.**

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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

## DESCRIPCIÓN

Agonistas de receptores 3(R3) del péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria (PACAP) y sus métodos de uso farmacológicos.

### Campo de la invención

Esta invención se refiere a polipéptidos recién identificados y al uso de tales polipéptidos para fines terapéuticos. Más en particular, los polipéptidos de la presente invención son útiles para estimular la liberación de insulina desde las células beta pancreáticas de una manera dependiente de glucosa, por lo que proporcionan una opción terapéutica para los individuos que padecen un trastorno metabólico tal como diabetes o intolerancia a la glucosa, un estado prediabético.

### Antecedentes de la técnica relacionada

La diabetes se caracteriza por un metabolismo alterado de la glucosa que se manifiesta, entre otras cosas, por una glucemia elevada en el paciente diabético. Los defectos subyacentes conducen a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: la diabetes tipo I, o diabetes mellitus insulino dependiente (DMID), que surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en las glándulas pancreáticas, y la diabetes tipo 2, o diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID), que se da en pacientes con una función alterada de las células beta y con alteraciones en la acción de la insulina.

Los pacientes diabéticos de tipo I se tratan actualmente con insulina, mientras la mayoría de los pacientes diabéticos de tipo 2 se tratan con agentes que estimulan la función de las células beta o con agentes que incrementan la sensibilidad tisular de los pacientes hacia la insulina. Con el tiempo, casi la mitad de los sujetos diabéticos de tipo 2 pierden la respuesta a estos agentes, y entonces se les debe administrar terapia de insulina. Los fármacos usados actualmente para tratar la diabetes tipo 2 incluyen:

*Inhibidores de la alfa-glucosidasa* (PRECOSE®, VOGLIBOSE™, y MIGLITOL®). Los inhibidores de la alfa-glucosidasa reducen las oscilaciones de la glucosa postprandial retrasando la absorción de la glucosa en el intestino. Estos fármacos son seguros y proporcionan tratamiento para los sujetos diabéticos afectados de manera leve a moderada. Sin embargo, se han informado efectos secundarios gastrointestinales en la bibliografía.

*Sensibilizadores a insulina*. Los sensibilizadores a insulina son fármacos que incrementan la respuesta del organismo a la insulina. Las tiazolidindionas tales como REZULIN™ (troglitazona) activan el receptor PPAR gamma y modulan la actividad de un grupo de genes que no se ha descrito completamente. Aunque son eficaces, estos fármacos se han asociado a hepatotoxicidad. Debido a la hepatotoxicidad, REZULIN ha sido retirado del mercado.

*Secretagogos de insulina* (sulfonilureas y otros agentes que actúan mediante el canal de K<sup>+</sup> dependiente de ATP). Las SFUs son la terapia estándar para los diabéticos de tipo 2 que tienen una glucemia en ayunas leve a moderada. Las SFUs tienen limitaciones, que incluyen la posibilidad de inducir hipoglucemia, aumento de peso, y tasas elevadas de ineficacia primaria y secundaria. Del 10 al 20% de los pacientes tratados inicialmente no muestran un efecto terapéutico significativo (fracaso primario). El fracaso secundario se manifiesta mediante una pérdida adicional del 20-30% del efecto terapéutico después de seis meses con una SFU. El tratamiento con insulina es necesario en un 50% de los pacientes que responden a SFU después de 5-7 años de terapia (Scheen, A.J., *et al.*, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 6:533-543 (1989)).

GLUCOPHAGE™ (metformina HCl) es una biguanida que disminuye la glucosa sanguínea disminuyendo la emisión hepática de glucosa e incrementando la absorción y utilización periférica de glucosa. El fármaco es eficaz para disminuir la glucosa sanguínea en sujetos afectados de manera leve y moderada, y no tiene los efectos secundarios de aumento de peso o la posibilidad de inducir hipoglucemia. Sin embargo, GLUCOPHAGE tiene varios efectos secundarios que incluyen alteraciones gastrointestinales y acidosis láctica. GLUCOPHAGE está contraindicado en pacientes diabéticos mayores de 70 años y en sujetos con insuficiencia de la función renal o hepática. Finalmente, GLUCOPHAGE tiene las mismas tasas de ineficacia primaria y secundaria de las SFUs.

El tratamiento con insulina se inicia después de que la dieta, el ejercicio y las medicaciones orales hayan fallado en el control adecuado de la glucosa sanguínea. Este tratamiento tiene las desventajas de que es inyectable, puede producir hipoglucemia y provoca aumento de peso.

Debido a los problemas asociados a los tratamientos actuales, se necesitan terapias nuevas para tratar la diabetes tipo 2. En particular, se necesitan tratamientos nuevos para mantener la secreción normal de insulina (dependiente de glucosa). Dichos fármacos nuevos deberían tener las siguientes características: depender de la glucosa para estimular la secreción de insulina, es decir, producir la secreción de insulina solamente en presencia de una glucosa sanguínea elevada; tasas bajas de fracaso primario y secundario; y preservar la función de las células de los islotes. La estrategia para desarrollar la terapia nueva descrita en esta memoria se basa en el mecanismo de señalización mediante monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), y en su efecto sobre la secreción de insulina.

El AMP cíclico es un regulador importante del proceso de secreción de insulina. La elevación de esta molécula señalizadora provoca el cierre de los canales de K<sup>+</sup> tras la activación de la ruta de la proteína quinasa A. El cierre de los canales de K<sup>+</sup> provoca la despolarización de la célula y la apertura posterior de los canales de Ca<sup>++</sup>, lo que a su vez conduce a la exocitosis de los gránulos de insulina. En ausencia de concentraciones bajas de glucosa se produce poco efecto, si es que llega a producirse, sobre la secreción de insulina (Weinhaus, A., *et al.*, *Diabetes* 47: 1426-1435 (1998)). Los secretagogos como el péptido activador de la adenilato ciclasa hipofisaria ("PACAP") y GLP-1 usan el sistema de AMPc para regular la secreción de insulina de una manera dependiente de glucosa (Komatsu, M., *et al.*, *Diabetes* 46: 1928-1938, (1997)). Los secretagogos de insulina que funcionan a través de la elevación del AMPc, tales como GLP-1 y PACAP, son también capaces de incrementar la síntesis de insulina, además de incrementar la liberación de insulina (Skoglund, G. *et al.*, *Diabetes* 49: 1156-1164, (2000). Borboni, P. *et al.*, *Endocrinology* 140: 5530-5537, (1999)).

PACAP es un estimulador potente de la secreción de insulina dependiente de glucosa desde las células beta pancreáticas. Se han descrito tres tipos de receptores de PACAP diferentes (R1, R2, y R3) (Harmar, A. *et al.*, *Pharmacol. Reviews* 50: 265-270 (1998)). PACAP no exhibe selectividad de receptor, y tiene actividades y potencias comparables en los tres receptores. R1 está localizado de manera predominante en el SNC, mientras R2 y R3 están más distribuidos. R2 está localizado en el SNC así como en el hígado, pulmones e intestino. R3 está localizado en el SNC, páncreas, músculo esquelético, corazón, riñón, tejido adiposo, testículos y estómago. Los trabajos recientes mantienen que R3 es responsable de la secreción de insulina desde las células beta (Inagaki, N. *et al.*, *PNAS* 91: 2679-2683, (1994)). Esta acción insulínica de PACAP está mediada por las proteínas Gs que unen GTP. La acumulación de AMPc intracelular a su vez activa los canales de cationes no selectivos de las células beta, lo que incrementa [Ca<sup>++</sup>] y provoca la exocitosis de los gránulos secretores que contienen insulina.

PACAP es el miembro más reciente de la superfamilia de hormonas peptídicas metabólicas, neuroendocrinas y neurotransmisoras que ejercen su acción a través de la ruta de transducción de señales mediada por AMPc (Arimura, *Regul. Peptides* 37:287-303 (1992)). Los péptidos biológicamente activos se liberan del precursor biosintético en dos formas moleculares, como un péptido de 38 aminoácidos (PACAP-38) y/o como un péptido de 27 aminoácidos (PACAP-27) con un extremo carboxilo amidado (Arimura, anteriormente mencionado).

Las concentraciones más elevadas de las dos formas del péptido se hallan en el cerebro y testículo (revisado en Arimura, anteriormente mencionado). La forma más corta del péptido, PACAP-27, muestra un 68% de homología estructural con el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Sin embargo, la distribución de PACAP y VIP en el sistema nervioso central indica que estos péptidos relacionados estructuralmente tienen funciones neurotransmisoras distintas (Koves *et al.*, *Neuroendocrinology* 54:159-169, (1991)).

Estudios recientes han demostrado los efectos biológicos diversos de PACAP-38, desde su papel en la reproducción (McArdle, *Endocrinology* 135:815-817 (1994)) hasta su capacidad de estimular la secreción de insulina (Yada *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:1280-1293 (1994)).

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido de 28 aminoácidos que se aisló por primera vez de intestino delgado de cerdo (Said y Mutt, *Science* 169: 1217-1278, 1970; Patente de EE.UU. n° 3.879.371). Este péptido pertenece a una familia de polipéptidos pequeños relacionados estructuralmente que incluye helodermina, secretina, las somatostatinas, y glucagón. Los efectos biológicos de VIP están mediados por la activación de proteínas receptoras asociadas a la membrana que están acopladas al sistema de señalización de AMPc intracelular. Estos receptores se conocían en un principio como VIP-R1 y VIP-R2, pero sin embargo más tarde se descubrió que eran los mismos receptores que PACAP-R2 y PACAP-R3. VIP exhibe actividades y potencias comparables en PACAP-R2 y PACAP-R3.

Para mejorar la estabilidad de VIP en fluido pulmonar humano, Bolin *et al* (*Biopolymers* 37: 57-66, (1995)) produjo una serie de variantes de VIP diseñadas para incrementar el contenido helicoidal de este péptido y reducir la degradación proteolítica. Las sustituciones se centraron en las posiciones 8, 12, 17, y 25-28, que se suponía que no eran importantes para la unión al receptor. Además, se añadió la secuencia "GGT" al extremo C-terminal de las mutélicas de VIP con la esperanza de proteger de manera más eficaz la hélice. Finalmente, para estabilizar adicionalmente la hélice, se sintetizaron diversas variantes cíclicas (patente de EE.UU. n° 5.677.419). Aunque estos intentos no iban dirigidos hacia la selectividad por el receptor, produjeron dos análogos (designados en esta memoria R3P0 y R3P4) que tenían una selectividad por PACAP-R3 de más de 100 veces (Gourlet *et al.*, *Peptides* 18: 403-408, (1997); Xia *et al.*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 281: 629-633, (1997)).

GLP-1 se libera de la célula L intestinal después de una comida y funciona como una hormona incretina (es decir, potencia la liberación de insulina inducida por glucosa desde la célula beta pancreática). Es un péptido de 37 aminoácidos, que se expresa de manera diferencial por el gen de glucagón, dependiendo del tipo de tejido. Los datos clínicos que apoyan el efecto beneficioso de elevar los niveles de AMPc en las células  $\beta$  se han recogido con GLP-1. Las infusiones de GLP-1 en diabéticos de tipo 2 escasamente controlados normalizaron sus glucemias en ayunas (Gutniak, M., *et al.*, *New Eng. J. Med.* 326:1316-1322. (1992)), y con infusiones más largas mejoraron la función de las células beta hasta la de los sujetos normales (Rachman, J. *et al.*, *Diabetes* 45: 1524-1530, (1996)). Un informe reciente ha demostrado que GLP-1 mejora la capacidad de las células  $\beta$  para responder a la glucosa en sujetos con intolerancia a la glucosa (Byrne M., *et al.*, *Diabetes* 47: 1259-1265 (1998)). Todos estos efectos, sin embargo, tienen una duración corta debido a la corta semivida del péptido. Recientemente, Novo Nordisk ha interrumpido los ensayos

clínicos con GLP-1. Este fracaso se ha debido supuestamente a una semivida del péptido muy corta en plasma, de unos pocos minutos.

EXENDIN 4™. Amylin Pharmaceuticals está llevando a cabo ensayos de fase I con EXENDIN 4 (AC2993), un péptido de 39 aminoácidos identificado inicialmente en Monstruo de Gila. Los ensayos de fase II han comenzado recientemente. Amylin afirma que los resultados preclínicos muestran una duración de 4 horas de la eficacia, y eficacia en modelos animales cuando se administra AC2993 de forma subcutánea, oral y nasal. Sin embargo, a dosis de 0,2 y 0,3 µg/kg, la incidencia de cefaleas, hipotensión postural, náuseas y vómitos fue significativa.

El documento US 5.677.419 se refiere a los análogos cíclicos de VIP. Sin embargo, no hay una discusión sobre la selectividad de estos análogos para ninguno de los receptores de VIP.

Gourlet *et al* (European Journal of Pharmacology 348 (1998); páginas 95 a 99) describe variantes de VIP en las que se han mutado los aminoácidos de las posiciones 22 y 24. Se informó que las mutaciones en estas posiciones produjeron variantes de VIP que no tenían selectividad de receptores en comparación con VIP, o que tuvieron una afinidad menor por el receptor VIP2 (R3) que VIP.

El documento WO 98/02453 describe péptidos que tienen una selectividad mayor por el receptor VIP1 (R2) que por el receptor VIP2 (R3).

Gourlet *et al* (Peptides, volumen 18, n° 3, páginas 403-408 (1997)) describe y caracteriza un único agonista polipeptídico para el receptor de VIP, RO25-1553.

Existe la necesidad de un péptido mejorado que tenga la actividad de secretagogo de insulina dependiente de glucosa de PACAP, GLP-1, o EXENDIN 4, y que tenga menos efectos secundarios.

Esta invención proporciona polipéptidos nuevos que funcionan *in vivo* como agonistas del receptor PACAP R3 (en adelante, R3) y que son eficaces en el tratamiento de enfermedades y trastornos que se pueden mejorar mediante agentes que tengan actividad agonista de R3. Preferiblemente, los polipéptidos de esta invención son agonistas selectivos de R3, que tienen una potencia mayor en R3 que en R2 y R1. Por ejemplo, pero no a modo de limitación, estos polipéptidos estimulan la síntesis y la liberación de insulina desde las células beta pancreáticas de una manera dependiente de glucosa, con la reducción posterior de la glucosa plasmática. Se demuestra que estos polipéptidos secretagogos de insulina estimulan la liberación de insulina en células de islotes de ratas y humanos *in vitro* e *in vivo*. A diferencia de PACAP-27, estos polipéptidos secretagogos disminuyen también la glucosa sanguínea *in vivo* en mayor medida que el control con vehículo tras la sobrecarga de glucosa.

Los polipéptidos de la presente invención proporcionan una terapia nueva para pacientes, por ejemplo, con trastornos metabólicos tales como los que resultan de una secreción de insulina endógena disminuida, en particular los diabéticos de tipo 2, o para pacientes con intolerancia a la glucosa, un estado prediabético que tiene una alteración leve de la secreción de insulina.

En particular, un aspecto de la invención es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las ID SEC N°s: 47, 72 a 82 y 85 y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos que muestran al menos una función biológica que es sustancialmente la misma que la de los polipéptidos de las ID SEC N°s enumeradas (en conjunto, "polipéptidos de esta invención"), lo que incluye los equivalentes funcionales de los mismos. Una realización preferida de esta invención es un polipéptido de ID SEC N°: 72 y los fragmentos, derivados y variantes del mismo que muestran al menos una función biológica que es sustancialmente la misma que la de los polipéptidos de las ID SEC N°s enumeradas.

Otra realización de la invención es un polinucleótido que codifica los polipéptidos de esta invención, y los vectores y células hospedadoras relacionadas necesarias para expresar de manera recombinante los polipéptidos de esta invención. Estas secuencias polinucleotídicas y secuencias que no son parte de la invención incluyen las identificadas como ID SEC N°s 204, 207 a 211, 214 a 230, y 232 a 321.

La invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un polipéptido según la invención con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona composiciones para terapia génica que comprenden un polinucleótido según la invención en combinación con un vehículo para terapia génica terapéuticamente eficaz.

También se proporcionan anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen de manera selectiva a los polipéptidos de esta invención. Tales anticuerpos son útiles para detectar los polipéptidos de esta invención, y se pueden identificar y producir mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, que incluyen los análogos a los descritos en el Ejemplo 17 más adelante.

La invención se dirige también a un método para tratar la diabetes y/o otras enfermedades o trastornos que se ven afectados por los polipéptidos de esta invención, y preferiblemente se efectúa mediante la función de agonista de R3 de los polipéptidos de esta invención, en un mamífero, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención a dicho mamífero.

También se describen métodos para producir los polipéptidos de esta invención, tanto recombinantes como sintéticos.

### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 representa las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de ID SEC N°s: 11 a 14, ID SEC N°: 18, ID SEC N°s: 21 a 26, ID SEC N°s: 32 a 36, ID SEC N°s: 40 a 53, ID SEC N°s: 57 a 61, ID SEC N°s: 63 a 99, ID SEC N°s: 102 a 119, ID SEC N°s: 121 a 137, ID SEC N°s: 139 a 177, ID SEC N°s: 179, 180, ID SEC N°s: 183 a 202, e ID SEC N°s: 322 a 341, que son los polipéptidos reivindicados.

La Fig. 2 es una alineación de secuencias de mutantes de VIP y polipéptidos VIP nativos, PACAP38, GLP-1, EXENDIN-4 y ejemplos de polipéptidos selectivos de R3. Los residuos conservados están en negrita y sombreados en gris oscuro, mientras los cambios conservativos están sombreados en gris claro.

La Fig. 3 es un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene la fusión GST-péptido.

Las Figs. 4A-4B son gráficos que muestran el efecto de GLP-1 o R3P3 sobre la liberación de insulina desde islotes de rata *in vitro*.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el efecto del péptido R3P3 sobre la eliminación de glucosa.

La Fig. 6 es un gráfico de barras que muestra el efecto de PACAP y de los polipéptidos relacionados sobre el contenido de agua intestinal en ratones Balb/C.

La Fig. 7 es un gráfico de barras que demuestra que una dosis de 1 nmol/kg de R3P3, R3P12, R3P13, o GLP-1 incrementa la eliminación de glucosa en ratas mediante una vía de administración subcutánea.

La Fig. 8 describe las secuencias polinucleotídicas ID SEC N°s 54 a 56 y 203 a 301 que codifican los polipéptidos de esta invención.

Los primeros 6 nucleótidos representan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bam HI, seguido por los siguientes 12 nucleótidos que codifican el sitio de reconocimiento del Factor Xa "IEGR". Los últimos 6 nucleótidos representan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Xho I o Eco RI precedidos por los 6 nucleótidos que codifican los dos codones de parada. Los nucleótidos entre el sitio del Factor Xa y los codones de parada codifican la secuencia de aminoácidos del polipéptido correspondiente. Los nucleótidos entre los dos sitios de restricción se clonan en los sitios de restricción correspondientes del vector pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech). Las ID SEC N°s se indican entre paréntesis.

La Fig. 9 muestra el efecto de PACAP-27, VIP y los agonistas selectivos del receptor sobre el ritmo cardíaco en perros conscientes (véase el ejemplo 15).

La Fig. 10 muestra la detección de R3P66 mediante anticuerpos policlonales producidos en conejos inmunizados con la secuencia C-terminal de R3P66 (Ac-CRKOVAACKYLQSIKNKRY-COOH), mediante el uso de ELISA.

### Descripción detallada de las realizaciones preferidas

Esta invención proporciona polipéptidos nuevos, y fragmentos, derivados y variantes de los mismos que muestran al menos una función biológica que es sustancialmente la misma que la de los polipéptidos de la Fig. 1 (en conjunto, polipéptidos de esta invención). Los polipéptidos de esta invención funcionan *in vivo* como agonistas de R3 o de otra forma en la prevención y/o el tratamiento de enfermedades o trastornos tales como diabetes, asma, hipertensión, problemas reproductivos masculinos que incluyen motilidad del semen humano, enfermedades cardiovasculares, úlceras, y otros trastornos identificados en esta memoria, o funcionan de otra manera como se describe más adelante en esta memoria. Preferiblemente, los polipéptidos de esta invención estimularán la liberación de insulina desde las células beta pancreáticas de una manera dependiente de glucosa.

Los polipéptidos de esta invención son agonistas de R3. Preferiblemente, son agonistas selectivos de R3 con una selectividad de al menos 10 veces para R3 respecto de R2 y/o R1. Más preferiblemente, son agonistas selectivos de R3 con una selectividad de al menos 100 veces para R3 respecto de R2 y/o R1. Lo más preferiblemente, estimulan la liberación de insulina al plasma de una manera dependiente de glucosa, sin inducir una estasis o incremento del nivel de glucosa plasmática que es contraproducente para el tratamiento, por ejemplo, de la diabetes tipo 2. Además, es preferible que los polipéptidos de esta invención sean agonistas selectivos del receptor R3, por lo que provocan, por ejemplo, un incremento de la liberación de insulina al plasma, a la vez que son selectivos respecto de otros receptores que son responsables de efectos secundarios desagradables o peligrosos, tales como la retención gastrointestinal de agua, y/o efectos cardiovasculares indeseables tales como un ritmo cardíaco incrementado. Se ha descubierto que la secreción de insulina mediada por R3 no provoca hipoglucemia, la activación de R2 conduce a la liberación de glucosa al plasma que es contraproducente para el tratamiento de la diabetes tipo 2 y retención gastrointestinal de agua, y la activación de R1 conduce a efectos cardiovasculares tales como un ritmo cardíaco incrementado.

Los polipéptidos de esta invención proporcionan una terapia nueva para pacientes con secreción de insulina endógena disminuida o intolerancia a la glucosa, en particular diabetes tipo 2.

#### A. Discusión

PACAP, VIP, GLP-1 y Exendin-4 son polipéptidos capaces de estimular la liberación de insulina de una manera dependiente de glucosa. Sin embargo, este hecho por sí solo no garantiza la reducción de la glucosa *in vivo*. Ya que se sabe que PACAP se une a los receptores PACAP-R1, -R2 y -R3, y se sabe que VIP se une a los receptores PACAP-R2 y -R3, se pensó que podían tener características estructurales conservadas similares. La siguiente alineación mediante superposición muestra las relaciones estructurales primarias:

			ID SEC	Nº
VIP	1	HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN-NH <sub>2</sub>	28	1
PACAP38	1	HSDGIFTDSY SRYRKQMAK KYLA AVLGR YKQRVKNK-NH <sub>2</sub>	38	2
GLP-1	1	HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFWLWKGR-NH <sub>2</sub>	30	3
Exendin 4	1	HGEGTFTSDL SKQMEEVLR LFIEWLKNNGG PSSGAPPPS-NH <sub>2</sub>	39	4

(en la que las abreviaturas de una letra de los aminoácidos se pueden hallar en Zubay, *Biochemistry* 2ª ed., 1988, MacMillan Publishing, Nueva York, pág. 33), y se definen más adelante. Los polipéptidos de la presente invención y los polipéptidos que no son parte de la invención (Fig. 1) están estrechamente relacionados con VIP en cuanto a su estructura primaria, con la excepción de ID SEC Nº: 57-61, 66-69, y 176, 177, 179, 180, 183-202 que están más estrechamente relacionados con PACAP.

Los presentes inventores han creado un polipéptido nuevo que es un agonista de R3, preferiblemente un agonista selectivo de R3, y/o que exhibe un efecto selectivo secretagogo de insulina dependiente de glucosa, en el que la activación selectiva del receptor PACAP R3 conduce de hecho a una ruta dependiente de glucosa para la secreción de insulina por las células beta pancreáticas, con la reducción concomitante de la glucosa *in vivo*. Desde ese punto de vista, primero se estudiaron las estructuras de PACAP-27 y VIP en un intento de determinar los residuos que tienen una mayor probabilidad de ser responsables de la selectividad por el receptor. Se sabe que PACAP y VIP no reducen la glucosa *in vivo*, sino que, más bien, estimulan la liberación de glucosa desde el hígado. Se ha demostrado que la activación de R2 incrementa los niveles plasmáticos de glucosa *in vivo*. Anteriormente, tanto PACAP como VIP se han sometido a mutagénesis de manera exhaustiva por diversas razones. Por ejemplo, las delecciones en serie de PACAP27 y PACAP38 desde ambos extremos confirmaron la importancia de ambos extremos para la unión al receptor (Gourlet *et al.*, *Eur. J. Pharm.* 287: 7-11, (1995); Gourlet *et al.*, *Regul. Peptides* 62: 125-130, (1996)). La unión a membranas de cerebro de rata y las actividades de adenilato ciclasa de las muteínas híbridas PACAP27/VIP implicó la importancia de los residuos N-terminales de PACAP para el reconocimiento de PACAP-R1 (Ando *et al.*, *Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids* 2:41-46, (1996)). El incremento de la basicidad de Leu<sup>17</sup>-PACAP27 y Leu<sup>17</sup>-VIP haciendo las mutaciones K15R, K20R, y K21R y la extensión del extremo C-terminal con la secuencia "GKR" condujo a un incremento de la duración de la actividad relajante traqueal en conejillo de indias, que se propuso que era debida a la protección de la unión a heparina (Kashimoto *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.* 805: 505-510, (1996)). Gourlet *et al.* (*Biochim. Biophys. Acta* 1314: 267-273, (1996)) demostró que la muteína Q16R de VIP y PACAP poseía afinidades mayores que sus polipéptidos nativos respectivos por PACAP-R2 y R1, respectivamente. Gourlet *et al.* (*Peptides* 18: 1539-1545, (1997)) desarrolló un agonista selectivo de R2 de elevada afinidad produciendo el péptido quimérico sustituido [K15, R16, L27] VIP(1-7)/GRF(8-27). La acilación N-terminal y la sustitución de D-Phe2 de este agonista selectivo condujo a un antagonista selectivo de R2 potente (Gourlet *et al.*, *Peptides* 18 1555-1560, (1997)). Las muteínas de VIP Y22L e Y22A, pero no Y22F, exhiben una afinidad más baja por PACAP-R3, lo que sugiere la importancia de un grupo aromático en la posición 22 para la unión al receptor R3 pero no para la unión al receptor R2 (Gourlet, *Eur. J. Biochem.* 348: 95-99, (1998)). Helodermina y helospectina, péptidos similares a VIP aislados del veneno de glándula salival de lagartos, exhiben una selectividad de 100 veces por PACAP-R3 (Gourlet, *Ann. NY Acad. Sci.* 865: 247-252, (1998)). El marcado mediante fotoafinidad de PACAP27 sustituyendo F6 e Y22 con p-benzoil-L-fenilalanina (pBz) o K15, K20, y K21 con pBz<sub>2</sub> pareció indicar que K15 y F22 son más cercanos a PACAP-R1 que F6, K20, y K21 (Cao *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 244: 400-406, (1997); Cao *et al.*, *Ann. NY Acad. Sci.*, 865: 82-91, (1998)).

Los inventores de esta memoria han descubierto varios polipéptidos que provocan la estimulación de la liberación de insulina de una manera dependiente de glucosa, y que provocan la reducción de la glucosa *in vivo*. Esos polipéptidos y los polipéptidos que no son parte de la presente invención tienen cierta similitud con VIP y PACAP. En particular, una alineación por superposición muestra lo siguiente:

				ID SEC	
				Nº	
5	VIP	1 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN-NH <sub>2</sub>	28	1	
	PACAP38	1 HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVL GKRYKQ RVKNK-NH <sub>2</sub>	38	2	
10	R3P1	Ac-HSDAVFTENY TKLRKQLAAK KYLNDLKKGG T-NH <sub>2</sub>	31	6	
	R3P3	1 HSDAVFTENY TKLRKQLAAK KYLNDLKKGG T	31	8	
	R3P12	1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKKGG T	31	15	
15	R3P13	1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKK-NH <sub>2</sub>	28	16	
	R3P36	1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKKKR Y	31	32	
20	R3P66	1 HSDAVFTDNY TRLRKQVAAK KYLQSIKNKR Y	31	72	

Sin embargo, no existen enseñanzas en la bibliografía científica o de patentes que sugieran que las modificaciones selectivas de las secuencias de VIP y PACAP conduzcan a un polipéptido con la capacidad de estimular la secreción de insulina de una manera dependiente de glucosa, y de reducir la concentración plasmática de glucosa.

A continuación se definirán ciertas expresiones usadas en toda esta memoria descriptiva, y otras se definirán a medida que se utilicen. La abreviatura de una letra para un aminoácido particular, su aminoácido correspondiente, y la abreviatura de tres letras son las siguientes: A, alanina (ala); C, cisteína (cys); D, ácido aspártico (asp); E, ácido glutámico (glu); F, fenilalanina (phe); G, glicocola (gly); H, histidina (his); I, isoleucina (ile); K, lisina (lys); L, leucina (leu); M, metionina (met); N, asparagina (asn); P, prolina (pro); Q, glutamina (gln); R, arginina (arg); S, serina (ser); T, treonina (thr); V, valina (val); W, triptófano (trp); Y, tirosina (tyr).

La expresión “polinucleótido que codifica un polipéptido” abarca un polinucleótido que incluye solamente la secuencia codificante del polipéptido, así como un polinucleótido que incluye secuencias adicionales codificantes y/o no codificantes. La presente invención se refiere además a los polinucleótidos que hibridan con las secuencias descritas anteriormente si existe una identidad entre las secuencias de al menos alrededor del 70%, preferiblemente al menos alrededor del 90%, y más preferiblemente al menos alrededor del 95%. La presente invención se refiere en particular a polinucleótidos que codifican polipéptidos que hibridan en condiciones rigurosas a los polinucleótidos descritos anteriormente. Como se usa aquí, la expresión “condiciones rigurosas” significa “condiciones de hibridación rigurosas”. Preferiblemente, la hibridación ocurrirá solamente si existe una identidad entre las secuencias de al menos alrededor del 90%, y preferiblemente alrededor del 95% al 97%. Los polinucleótidos que hibridan con los polinucleótidos descritos anteriormente en una realización preferida codifican polipéptidos que mantienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por los cADNs.

“Equivalente funcional” y “sustancialmente la misma función o actividad biológica” significa en cada caso que el grado de actividad biológica está dentro de alrededor del 30% al 100% o más de la actividad biológica mostrada por el polipéptido con el que se está comparando, cuando la actividad biológica de cada polipéptido se determina mediante el mismo procedimiento. Por ejemplo, un polipéptido que es equivalente funcionalmente a un polipéptido de la Fig. 1 es uno que cuando se analiza en el ensayo de proximidad con centelleo de AMP cíclico del Ejemplo Específico 16, muestra la acumulación de AMPc en la línea de células CHO que expresan del receptor PACAP/VIP R2 (PACAP R3) humano.

Un polipéptido de esta invención que es un agonista de R3 es uno que muestra alrededor del 30% - 100% o más de actividad máxima de agonista de PACAP-27 R3 cuando se analiza con el protocolo del Ejemplo 16. Los polipéptidos preferidos de esta invención que son agonistas selectivos de R3 respecto de los receptores PACAP R2 y R1 son aquellos polipéptidos que muestran una proporción de actividad de agonista de R3 respecto de R2 de alrededor de 10:1 o más, y más preferiblemente, alrededor de 100:1 o más, y/o muestran una proporción de actividad de agonista de R3 respecto de la actividad en el receptor R1 de alrededor de 10:1 o más, y más preferiblemente, alrededor de 100:1 o más cuando el polipéptido se analiza con el protocolo del Ejemplo 16, mediante el uso de células que expresan los receptores apropiados.

“Condiciones de hibridación rigurosas” se refiere a una incubación durante la noche de los dos fragmentos de polinucleótidos a hibridar a 42°C en una disolución que comprende formamida al 50%, SSC 5x (NaCl 750 mM, citrato sódico 75 mM), fosfato sódico 50 mM (pH 7,6), disolución de Denhardt, sulfato de dextrano al 10%, y 20 µg/ml de ADN de esperma de salmón desnaturalizado y fragmentado, seguido de lavado de los filtros en SSC 0,1x a alrededor de 65°C.

Los términos “fragmento”, “derivado” y “variante”, cuando se refieren a los polipéptidos de la Fig. 1, significan fragmentos, derivados y variantes de los polipéptidos que mantienen sustancialmente la misma función o actividad biológica de tales polipéptidos, como se describe adicionalmente más adelante.

5 Un análogo incluye un polipéptido que incluye dentro de él la secuencia de aminoácidos del polipéptido de esta invención. El polipéptido activo de esta invención se puede escindir de los aminoácidos adicionales que completan la molécula de propolipéptido mediante procesos naturales *in vivo*, o mediante procedimientos bien conocidos en la técnica tales como escisión enzimática o química. Por ejemplo, el péptido VIP nativo de 28 aminoácidos se expresa de manera natural en forma de un polipéptido mucho más largo que después se procesa *in vivo* para liberar el péptido  
10 maduro activo de 28 aminoácidos.

Un fragmento es una porción del polipéptido que mantiene una actividad funcional sustancialmente similar, como se muestra en los modelos *in vivo* descritos en esta memoria más adelante.

15 Un derivado incluye todas las modificaciones del polipéptido que preservan sustancialmente las funciones descritas en esta memoria e incluyen una estructura adicional y una función concomitante, p.ej., polipéptidos PEGilados que tienen una semivida mayor, polipéptidos de fusión que confieren una especificidad de selección de objetivo o una actividad adicional tal como toxicidad para un objetivo deseado, como se describe más adelante.

20 Los polipéptidos de la presente invención pueden ser polipéptidos recombinantes, polipéptidos naturales purificados o polipéptidos sintéticos.

El fragmento, derivado o variante de los polipéptidos de la presente invención puede ser (i) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos están sustituidos con un residuo de aminoácido conservado o no conservado  
25 (preferiblemente un residuo de aminoácido conservado), y tal residuo de aminoácido sustituido puede ser o no uno codificado por el código genético, o (ii) uno en el que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente, o (iii) uno en el que el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) uno en el que los aminoácidos adicionales están fusionados al polipéptido maduro, tal como una secuencia líder o secretora o una secuencia que se  
30 emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de propolipéptido, o (v) uno en el que la secuencia del polipéptido está fusionada con un polipéptido mayor, es decir, albúmina humana, un anticuerpo o Fc, para una duración incrementada del efecto. Se considera que tales fragmentos, derivados y variantes y análogos están dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria.

35 Preferiblemente, los derivados de la presente invención contendrán sustituciones conservativas de aminoácidos (definidas más adelante) hechas en uno o más residuos de aminoácidos predichos, preferiblemente no esenciales. Un residuo de aminoácido “no esencial” es un residuo que se puede alterar de la secuencia de tipo natural de una proteína sin alterar la actividad biológica, mientras un residuo de aminoácido “esencial” es necesario para la actividad biológica. Una “sustitución conservativa de aminoácido” es una en la que el residuo de aminoácido se sustituye con un residuo  
40 de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen los aminoácidos con cadenas laterales básicas (p.ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p.ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p.ej., glicocola, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales apolares (p.ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (p.ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p.ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, his-  
45 tidina). Las sustituciones no conservativas no se harían para residuos de aminoácidos conservados o para residuos de aminoácidos presentes dentro de un dominio conservado de la proteína, tales como los residuos 19 y 27, en los que tales residuos son esenciales para la actividad de la proteína, tal como para la actividad de R3 y/o para la selectividad de R3. Los fragmentos o las porciones biológicamente activas incluyen fragmentos de polipéptidos adecuados para el  
50 uso como un medicamento, para generar anticuerpos, como un reactivo de investigación, y similares. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares a, o derivadas de, las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de esta invención y que exhiben al menos una actividad de ese polipéptido, pero que incluyen menos aminoácidos que los polipéptidos de tamaño completo descritos en esta memoria. En general, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad de los polipéptidos.  
55 Una porción biológicamente activa de un polipéptido puede ser un péptido que tiene, por ejemplo, 5 o más aminoácidos de longitud. Tales porciones biológicamente activas se pueden preparar de manera sintética o mediante técnicas recombinantes, y se puede analizar una o más de las actividades funcionales de un polipéptido de esta invención con el uso de medios descritos en esta memoria y/o bien conocidos en la técnica.

60 Además, los derivados preferidos de la presente invención incluyen polipéptidos maduros que se han fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol “PEG”). En el caso de la PEGilación, la fusión del polipéptido a PEG se puede llevar a cabo por cualquier medio conocido para un experto en la técnica. Por ejemplo, la PEGilación se puede llevar a cabo mediante la introducción primero de una mutación de cisteína en el polipéptido,  
65 seguido por una derivatización específica de sitio con PEG-maleimida. La cisteína se puede añadir al extremo C-terminal de los péptidos (Véase, por ejemplo, Tsutsumi *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 18 de jul. de 2000:97(15):8548-53).



Las variantes de los polipéptidos de esta invención y los polipéptidos que no son parte de la presente invención incluyen polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de las ID SEC N°s de la Fig. 1 o un dominio de los mismos. La expresión “suficientemente similar” significa una primera secuencia de aminoácidos que contiene un número suficiente o mínimo de residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes respecto de una segunda secuencia de aminoácidos, de forma que la primera y la segunda secuencia de aminoácidos tienen un dominio estructural común y/o una actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es idéntico en al menos un 45%, preferiblemente alrededor de un 75% a un 98%, se definen esta memoria como suficientemente similares. Preferiblemente, las variantes serán suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos preferidos de esta invención.

Las variantes incluyen variantes de polipéptidos codificados por un polinucleótido que hibrida a un polinucleótido de esta invención o a un complemento del mismo en condiciones rigurosas. Tales variantes mantienen en general la actividad funcional de los polipéptidos de esta invención. Se pueden usar bibliotecas de fragmentos de los polinucleótidos para generar una población heterogénea de fragmentos para el cribado y la posterior selección. Por ejemplo, se puede generar una biblioteca de fragmentos tratando un fragmento de PCR bicatenario de un polinucleótido con una nucleasa en condiciones en las cuales se producen mellas solamente alrededor de una vez por molécula, desnaturalizando el ADN bicatenario, renaturalizando el ADN para formar ADN bicatenario que puede incluir pares codificantes/complementarios de productos mellados de manera diferente, eliminando las porciones monocatenarias de las moléculas bicatenarias reformadas mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligando la biblioteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Mediante este método, se puede derivar una biblioteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños del polipéptido de esta invención.

Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas de R3 se pueden identificar mediante el cribado de bibliotecas combinatorias de mutantes, por ejemplo mutantes por truncamiento, de los polipéptidos de esta invención en función de su actividad agonista de R3.

En una realización, se genera una biblioteca heterogénea de análogos mediante mutagénesis combinatoria de ácidos nucleicos y está codificada por una biblioteca génica heterogénea. Se puede producir una biblioteca heterogénea de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos con secuencias genéticas de manera que es expresable un grupo degenerado de secuencias de aminoácidos de las variantes potenciales en forma de polipéptidos individuales, o, de manera alternativa, en forma de un grupo de proteínas de fusión mayores (por ejemplo, para expresión en fagos) que contienen el grupo de las secuencias en ellas. Existe una diversidad de métodos que se pueden usar para producir bibliotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia genética degenerada se puede llevar a cabo en un sintetizador automático de ADN, y el gen sintético se liga después en el vector de expresión apropiado. El uso de un grupo degenerado de genes permite el suministro, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican el grupo deseado de secuencias variantes potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados se conocen en la técnica (véase, p.ej., Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3; Itakura *et al* (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53:323; Itakura *et al* (1984) *Science* 198:1056; Ike *et al* (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477).

Se conocen varias técnicas en la técnica para el cribado de los productos génicos de las bibliotecas combinatorias producidas mediante mutaciones puntuales o truncamientos, y para el cribado de las bibliotecas de cADN en busca de productos génicos que tienen una propiedad seleccionada. Tales técnicas son adaptables para el cribado rápido de las bibliotecas génicas generadas mediante la mutagénesis combinatoria de los polipéptidos agonistas de R. Las técnicas más ampliamente usadas, que son adaptables para el análisis de alto rendimiento para cribar grandes bibliotecas génicas, incluyen en general el clonado de la biblioteca génica en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la biblioteca de vectores resultante y la expresión de los genes combinatorios en condiciones en las que la detección de una actividad deseada facilita el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se detectó. Se puede usar la mutagénesis de conjunto recurrente (REM), una técnica que incrementa la frecuencia de los mutantes funcionales en las bibliotecas, en combinación con los ensayos de cribado para identificar las variantes deseadas.

La invención también proporciona polipéptidos quiméricos o de fusión. Los ejemplos incluyen los polipéptidos y los polipéptidos que no son parte de la invención descritos en las ID SEC N°s 18 y 172 que son fusiones de la secuencia de selección de objetivo pancreático “SWCEPGWCR” (Rajotte D., *et al* (1998) *J Clin Invest* 102:430-437) con las ID SEC N°s 8 y 32, respectivamente. La secuencia de selección de objetivo está diseñada para localizar la administración del polipéptido en el páncreas para minimizar los efectos secundarios potenciales. Los polipéptidos de esta invención pueden estar compuestos de aminoácidos unidos entre sí mediante enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres peptídicos, y pueden contener aminoácidos distintos de los 20 aminoácidos codificados genéticamente. Los polipéptidos se pueden modificar mediante procesos naturales, tales como procesamiento postraducciona, o mediante técnicas de modificación química que se conocen bien en la técnica. Tales modificaciones están bien descritas en libros de texto básicos y en monografías más detalladas, así como en la abundante bibliografía de investigación. Las modificaciones se pueden dar en cualquier lugar de un polipéptido, lo que incluye el esqueleto peptídico, las cadenas laterales de los aminoácidos y los extremos amino o carboxilo. Se apreciará que el mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o en grados variables en varios sitios de un polipéptido dado. Además, un polipéptido dado puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden estar ramificados, por ejemplo, como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificaciones. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados puede ser el resultado de procesos naturales postraducciona-

les, o se pueden producir mediante métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen la acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, ciclación por entrecruzamiento, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. (Véase, por ejemplo, *Proteins, Structure and Molecular Properties*, 2ª ed., T.E. Creighton, W.H. Freeman and Company, Nueva York (1993); *Posttranslational Covalent Modification of Proteins*, B.C. Johnson, ed., Academic Press, Nueva York, págs. 1-12 (1983); Seifter *et al.*, *Meth. Enzymol* 182:626-646 (1990); Rattan *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 663:48-62 (1992)).

Los polipéptidos de la presente invención y los polipéptidos que no son parte de la presente invención incluyen los polipéptidos de la Fig. 1 que tienen las ID SEC N°s: 11 a 14, ID SEC N°: 18, ID SEC N°s: 21 a 26, ID SEC N°s: 32 a 36, ID SEC N°s: 40 a 53, ID SEC N°s: 57 a 61, ID SEC N°s: 63 a 99, ID SEC N°s: 102 a 119, ID SEC N°s: 121 a 137, ID SEC N°s: 139 a 177, ID SEC N°s: 179, 180, ID SEC N°s: 183 a 202, 322 a 341, así como aquellas secuencias que tienen variaciones insustanciales de secuencia a partir de ellas. Una "variación insustancial" incluiría cualquier secuencia, sustitución o variante de delección que mantenga sustancialmente al menos una función biológica de los polipéptidos de esta invención, preferiblemente la actividad agonista de R3, y más preferiblemente la actividad agonista selectiva de R3, y lo más preferiblemente, la actividad secretora de insulina demostrada en esta memoria. Estos equivalentes funcionales pueden incluir preferiblemente los polipéptidos que tienen al menos alrededor de un 90% de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1, y más preferiblemente al menos un 95% de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1, y aún más preferiblemente al menos un 97% de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1, y también incluyen las porciones de tales polipéptidos que tienen sustancialmente la misma actividad biológica. Sin embargo, cualquier polipéptido que tenga una variación insustancial de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos de la Fig. 1 que muestre equivalencia funcional como se describe adicionalmente en esta memoria está incluido en la descripción de la presente invención.

Como se conoce en la técnica, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina comparando la secuencia de aminoácidos y sus sustituciones de aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Tales sustituciones conservativas incluyen las descritas anteriormente y las de Dayhoff en *The Atlas of Protein Sequence and Structure* 5 (1978), y las de Argos en *EMBO J.*, 8:779-785 (1989). Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios conservativos:

- ala, pro, gly, gln, asn, ser, thr;
- cys, ser, tyr, thr;
- val, ile, leu, met, ala, phe;
- lys, arg, his;
- phe, tyr, trp, his; y
- asp, glu.

La presente invención también se refiere a los vectores que incluyen los polinucleótidos de la presente invención, las células hospedadoras que se modifican genéticamente con los vectores de la invención, y la producción de los polipéptidos de la invención mediante técnicas recombinantes. Las células hospedadoras se pueden modificar genéticamente (transducir o transformar o transfectar) con los vectores de esta invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonado o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de un plásmido, una partícula viral, un fago, etc. Las células hospedadoras modificadas se pueden cultivar en medios nutritivos convencionales modificados según sea apropiado para la activación de los promotores, o para la selección de los transformantes. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas previamente para la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el técnico experto. El polinucleótido de la presente invención se puede emplear para producir un polipéptido mediante técnicas recombinantes. Así, por ejemplo, la secuencia polinucleotídica se puede incluir en cualquiera de una diversidad de vehículos de expresión, en particular vectores o plásmidos para la expresión de un polipéptido. Tales vectores incluyen secuencias de ADN cromosómicas, no cromosómicas y sintéticas, p.ej., derivados de SV40; plásmidos bacterianos; ADN de fagos; plásmidos de levaduras; vectores derivados de combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, viruela aviar y pseudorrabia. Sin embargo, se puede usar cualquier otro vector o plásmido con tal de que sea replicable y viable en el hospedador.

La secuencia de ADN apropiada se puede insertar en el vector mediante una diversidad de procedimientos. En general, la secuencia de ADN se inserta en un sitio apropiado de endonucleasa de restricción mediante procedimientos conocidos en la técnica. Se considera que tales procedimientos y otros procedimientos están dentro del alcance de los ex-

5 pertos en la técnica. La secuencia de ADN del vector de expresión se une de manera operable a una/varias secuencia(s) de control de la expresión apropiada(s) (promotor) para dirigir la síntesis del ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar: promotor LTR o SV40, el lac o trp de *E. coli*, el promotor P<sub>L</sub> de fago lambda u otros promotores que se sabe que controlan la expresión de genes en las células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión contiene también un sitio de unión al ribosoma para la iniciación de la traducción y un terminador de la transcripción. El vector también puede incluir secuencias apropiadas para amplificar la expresión. Además, los vectores de expresión contienen preferiblemente un gen para proporcionar un rasgo fenotípico para la selección de las células hospedadoras transformadas, tal como dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para el cultivo de células eucarióticas, o tal como resistencia a tetraciclina o ampicilina en *E. coli*. El vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se describió anteriormente en esta memoria, así como un promotor o secuencia de control apropiada, se puede emplear para transformar un hospedador apropiado, para permitir que el hospedador exprese la proteína. Como ejemplos representativos de los hospedadores apropiados se pueden mencionar: células bacterianas, tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; células fúngicas, tales como levadura; células de insecto, tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9; células de animales, tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus; células vegetales, etc. Se considera que la selección de un hospedador apropiado está dentro del alcance de los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas de esta memoria.

20 La presente invención también incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias de la invención como se describieron en líneas generales anteriormente. Las construcciones comprenden un vector, tal como un plásmido o vector viral, en el que se ha insertado una secuencia de la invención, en una orientación directa o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras, que incluyen, por ejemplo, un promotor unido de manera operable a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen un gran número de vectores y promotores adecuados, y están disponibles comercialmente. Los siguientes vectores se proporcionan a modo de ejemplo. Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK, pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pOG44, pXT1, pSG (Stratagene) pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede usar cualquier otro plásmido o vector con tal de que sea replicable y viable en el hospedador. Las regiones promotoras se pueden seleccionar de cualquier gen deseado mediante el uso de vectores con CAT (cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Los promotores bacterianos nombrados particulares incluyen lacI, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> y trp. Los promotores eucarióticos incluyen el temprano inmediato de CMV, timidina quinasa de HSV, temprano y tardío de SV40, LTRs de retrovirus, y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y del promotor apropiado está dentro del nivel de experiencia habitual en la técnica.

35 La presente invención también se refiere a las células hospedadoras que contienen la construcción anteriormente descrita. La célula hospedadora puede ser una célula eucariótica superior, tal como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior, tal como una célula de levadura, o la célula hospedadora puede ser una célula procariótica, tal como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en las células hospedadoras se puede llevar a cabo mediante transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano, o electroporación (Davis, L., Dibner, M., Battey, I., Basic Methods in Molecular Biology, (1986)). Las construcciones en células hospedadoras se pueden usar de una manera convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. De manera alternativa, los polipéptidos de la invención se pueden producir de manera sintética mediante sintetizadores convencionales de péptidos.

45 Las proteínas maduras se pueden expresar en células de mamíferos, levaduras, bacterias o en otras células bajo el control de promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células para producir tales proteínas mediante el uso de los ARNs derivados de las construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonado y expresión apropiados para el uso con hospedadores procarióticos y eucarióticos se describen en Sambrook, *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, (Cold Spring Harbor, N.Y., 1989), cuya descripción se incorpora en esta memoria como referencia.

50 La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención mediante eucariotas superiores se incrementa insertando una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos que actúan en cis del ADN, habitualmente de alrededor de 10 a 300 pb, que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 del lado retrasado del origen de replicación (pb 100 a 270), un potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, un potenciador de polioma del lado retrasado del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus. En general, los vectores de expresión recombinantes incluirán orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de la célula hospedadora, p.ej., el gen de resistencia a ampicilina de *E. coli* y el gen TRP1 de *S. cerevisiae*, y un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural en 3'. Tales promotores pueden derivarse de operones que codifican enzimas glicolíticas tales como 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), factor  $\alpha$ , fosfatasa ácida, o proteínas de choque térmico, entre otras. La secuencia estructural heteróloga se monta en una fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación, y preferiblemente con una secuencia líder capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida hacia el espacio periplásmico o el medio extracelular. De forma opcional, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido de identificación en posición N-terminal, que confiere características deseadas, p.ej., la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con señales adecuadas de traducción, iniciación y terminación en un marco de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprenderá uno o más marcadores fenotípicos seleccionables y un origen de replicación para asegurar el mantenimiento del vector y, si se desea, para facilitar la amplificación dentro del hospedador. Los hospedadores procarióticos adecuados para la transformación incluyen *E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces* y *Staphylococcus*, aunque también se pueden emplear otras como se desee. Los vectores de expresión útiles para el uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y un origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos disponibles comercialmente que comprenden elementos genéticos del vector de clonado conocido pBR322 (ATCC 37017). Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Farmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (Promega Biotec, Madison, Wis., EE.UU.). Estas secciones de la "columna vertebral" de pBR322 se combinan con un promotor apropiado y con la secuencia estructural a expresar.

Después de la transformación de una cepa hospedadora adecuada y el cultivo de la cepa hospedadora hasta una densidad celular apropiada, el promotor seleccionado se desreprime por medios apropiados (p.ej., variación de temperatura o inducción química) y las células se cultivan durante un periodo adicional. Las células se recogen generalmente mediante centrifugación, se homogeneizan por medios físicos o químicos, y el extracto bruto resultante se guarda para la purificación posterior. Las células microbianas empleadas en la expresión de las proteínas se pueden homogeneizar mediante cualquier método conveniente, que incluye ciclos de congelación-descongelación, sonicación, homogenización mecánica, o el uso de agentes de lisis celular.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células mamíferas para expresar proteínas recombinantes. Los ejemplos de sistemas de expresión mamíferos incluyen las líneas COS-7 de fibroblastos de riñón de mono, descritas por Gluzman, Cell 23:175 (1981), y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo, las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión mamíferos comprenderán un origen de replicación, un promotor y potenciador adecuados, y también cualquier sitio de unión al ribosoma necesario, sitio de poliadenilación, sitios donantes y aceptores de corte y empalme, secuencias de terminación transcripcional, y secuencias no transcritas flanqueantes de 5'. Se pueden usar las secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, el origen de SV40, el promotor temprano, potenciador, sitio de corte empalme y de poliadenilación, para proporcionar los elementos genéticos no transcritos necesarios.

Los polipéptidos de la presente invención se pueden recuperar y purificar de los cultivos de células recombinantes mediante métodos usados con anterioridad, que incluyen la precipitación con sulfato amónico o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía con hidroxipatito y cromatografía con lectina. Se pueden usar etapas de replegamiento de proteínas, según sea necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Finalmente, se puede emplear la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) para las etapas de purificación finales.

Los polipéptidos de esta invención pueden ser el producto de procedimientos sintéticos químicos, o se pueden producir mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador procariota o eucariota (por ejemplo, mediante células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, de insectos o de mamíferos en cultivo). Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de esta invención pueden estar glicosilados con carbohidratos de mamíferos o de otros eucariotas, o pueden estar sin glicosilar. Los polipéptidos de esta invención pueden incluir también un residuo de aminoácido de metionina inicial. Un polipéptido aislado o purificado de esta invención, o una porción biológicamente activa del mismo, está sustancialmente exento de otro material celular, o del medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente exento de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Preferiblemente, un polipéptido aislado de esta invención está sustancialmente exento de material celular y tiene menos de alrededor del 30% (en peso seco) de material no polipeptídico o contaminante. Cuando se produce de manera recombinante el polipéptido de esta invención o una porción biológicamente activa del mismo, preferiblemente el medio de cultivo representa menos de alrededor del 30% del volumen de la preparación de polipéptido. Cuando esta invención se produce mediante síntesis química, preferiblemente las preparaciones contienen menos de alrededor del 30% en peso seco de los precursores químicos o de productos químicos que no son de la invención.

Los polipéptidos de esta invención se pueden aislar de manera conveniente como se describe en los ejemplos específicos más adelante. Una preparación de polipéptido purificado tiene una pureza de al menos alrededor del 70%; preferiblemente, las preparaciones tienen una pureza del 85% al 99%. La pureza de las preparaciones se puede determinar mediante cualquier medio conocido en la técnica, tal como electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida y cromatografía líquida/espectrometría de masas.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican un polipéptido de esta invención se pueden sintetizar, completa o parcialmente, mediante el uso de métodos químicos bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Caruthers *et al*, Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 215 - 223, 1980; Horn *et al*, Nucl. Acids Res. Symp. Ser. 225-232, 1980). El polinucleótido que codifica el polipéptido se puede clonar después en un vector de expresión para expresar el polipéptido.

Como entenderán los expertos en la técnica, puede ser ventajoso producir secuencias nucleotídicas que codifican el polipéptido que posean codones que no son los naturales. Por ejemplo, se pueden seleccionar los codones preferidos

por un hospedador procariótico o eucariótico particular para incrementar la proporción de expresión de polipéptido o para producir un transcrito de ARN que tiene propiedades deseables, tales como una semivida que es más larga que la del transcrito generado a partir de la secuencia natural.

- 5 Las secuencias nucleotídicas descritas aquí se pueden modificar mediante el uso de métodos conocidos en general en la técnica para alterar las secuencias codificantes de polipéptidos por varias razones, que incluyen, pero sin limitación, las alteraciones que modifican la finalización, el procesamiento y/o la expresión del polipéptido o del producto de ARNm. Se puede usar el reordenamiento aleatorio del ADN mediante fragmentación aleatoria y reconstrucción mediante PCR de los fragmentos génicos y oligonucleótidos sintéticos para modificar las secuencias nucleotídicas.
- 10 Por ejemplo, se puede usar la mutagénesis dirigida para insertar sitios de restricción nuevos, alterar los patrones de glicosilación, cambiar la preferencia por los códon, producir variantes de corte y empalme, e introducir mutaciones, etc.

- De forma alternativa, los polipéptidos de esta invención se pueden producir mediante el uso de métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, tales como mediante síntesis peptídica directa con el uso de técnicas en fase sólida (véase, por ejemplo, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149 - 2154, 1963; Roberge *et al*, *Science*, 269, 202 - 204, 1995). La síntesis polipeptídica se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas manuales o mediante la automatización. La síntesis automatizada se puede llevar a cabo, por ejemplo, mediante el uso del sintetizador de péptidos 431A de Applied Biosystems (Perkin Elmer). Opcionalmente, los fragmentos del polipéptido se pueden sintetizar
- 20 por separado y combinarlos mediante el uso de métodos químicos para producir una molécula de tamaño completo.

- El polipéptido recién sintetizado se puede purificar sustancialmente mediante cromatografía líquida de alto rendimiento preparativa (véase, por ejemplo, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., Nueva York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético de la presente invención se puede confirmar mediante el análisis de los aminoácidos o secuenciación mediante, por ejemplo, el procedimiento de degradación de Edman (véase Creighton, anteriormente mencionado). Además, cualquier porción de la secuencia de aminoácidos del polipéptido se puede alterar durante la síntesis directa y/o combinar mediante el uso de métodos químicos con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o un polipéptido de fusión.
- 25

- Los polipéptidos de la presente invención, como resultado de la capacidad de estimular la secreción de insulina de las células de los islotes pancreáticos *in vitro*, y de provocar una disminución de la glucosa sanguínea *in vivo*, se pueden emplear en el tratamiento de la diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente). Además, los polipéptidos se pueden usar para evitar que los sujetos con intolerancia a la glucosa lleguen a desarrollar diabetes tipo 2. Además, los polipéptidos de la invención se pueden usar para el tratamiento del asma (Bolin *et al*, *Biopolymer* 37:57-66 (1995); patente de EE.UU. n° 5.677.419) (que demuestra que el polipéptido R3P0 es activo en la relajación del músculo liso traqueal de conejillos de indias); inducción de hipotensión (VIP induce hipotensión, taquicardia y rubefacción facial en los pacientes asmáticos (Morice, A.H., y Sever, P.S., *Peptides* 7:279-280 (1986); Morice, A., *et al.*, *The Lancet* II, 1225-1227 (1983)), problemas reproductivos masculinos (Siow, Y., *et al.*, *Effects of vasoactive intestinal peptide on human sperm motility*, *Arch. Androl.* jul-ago. de 1999; 43(1):67-71); como agente anti-apoptosis/neuroprotector (Brenneman D.E., *et al.*, *VIP neurotrophism in the central nervous system: multiple effectors and identification of a femtomolar-acting neuroprotective peptide*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 11 de dic. de 1998; 865:207-12); cardioprotección durante episodios isquémicos (Kalfin R., *et al.*, *Protective role of intracoronary vasoactive intestinal peptide in ischemic and reperfused myocardium*, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, feb. de 1994; 268(2):952-8; Das, D.K., *et al.*, *Coordinated role of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in cardioprotection*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 11 de dic. de 1998; 865:297-308), y finalmente como agente antiulceroso (Tuncel, *et al.*, *The protective effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on stress-induced gastric ulceration in rats*, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 11 de dic. de 1998; 865:309-22).
- 30
- 35
- 40
- 45

- Los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica para administración parenteral. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del polipéptido y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tal vehículo incluye, pero sin limitación, solución salina, solución salina tamponada, dextrosa, agua, glicerol, etanol y las combinaciones de los mismos. La formulación debería ajustarse al modo de administración. La invención también proporciona un envase o equipo farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos de uno o más ingredientes de las formulaciones farmacéuticas de la invención. En tal(es) recipiente(s) puede haber una nota en la forma prescrita por un organismo público que regule la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, y cuya nota refleje la aprobación por parte del organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración humana. Además, los polipéptidos de la presente invención se pueden emplear junto con otros compuestos terapéuticos.
- 50
- 55

- Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar de una manera conveniente, tal como mediante vía oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad que es eficaz para el tratamiento y/o la profilaxis de la indicación específica. En general, se administran en una cantidad de al menos alrededor de 350 ng (0,1 nmoles)/kg de peso corporal, y en la mayoría de los casos se administran en una cantidad no mayor de alrededor de 35 µg (10 nmoles)/kg de peso corporal por día. En la mayoría de los casos, la dosis es de alrededor de 0,1 µg/kg hasta alrededor de 100 mg/kg de peso corporal por día, teniendo en cuenta la vía de administración, síntomas, etc. Estas cifras no tienen en cuenta la biodisponibilidad del péptido *in vivo*, en cuyo caso se puede usar más o menos para alcanzar la dosis eficaz deseada. Alguien de experiencia habitual en la técnica es capaz de determinar, por medio de experimentos de dosificación u otros medios convencionales, la cantidad aproximada a usar para producir una dosis eficaz.
- 60
- 65

Un polipéptido de la invención se puede emplear también de acuerdo con la presente invención mediante la expresión de tal polipéptido *in vivo*, lo cual se denomina a menudo "terapia génica". Así, por ejemplo, las células se pueden modificar con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica el polipéptido *ex vivo*, y las células modificadas se administran después al paciente a tratar con el polipéptido. Tales métodos se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, las células se pueden modificar mediante procedimientos conocidos en la técnica mediante el uso de una partícula retroviral que contiene ARN que codifica el polipéptido de la presente invención.

La administración local de los secretagogos de insulina mediante el uso de la terapia génica puede proporcionar el agente terapéutico en el área seleccionada como objetivo, es decir, el páncreas. Por ejemplo, se usó un promotor específico de páncreas para crear un modelo de ratón de tumor pancreático de las células beta (Hanahan, D., Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes, *Nature* 315(6015):115-22 (1985)).

Se contemplan las metodologías de terapia génica tanto *in vitro* como *in vivo*. Se conocen varios métodos para la transferencia de genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Véase, p.ej., Mulligan, "The Basic Science Of Gene Therapy", *Science*, 260: 926-31 (1993). Estos métodos incluyen:

1) Transferencia génica directa. Véase, p.ej., Wolff *et al.*, "Direct Gene transfer Into Mouse Muscle *In Vivo*", *Science*, 247:1465-68 (1990);

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Véase, p.ej., Caplen *et al.*, "Liposome-mediated CFTR Gene Transfer To The Nasal Epithelium Of Patients With Cystic Fibrosis", *Nature Med.* 3: 39-46 (1995); Crystal, "The Gene As A Drug", *Nature Med.* 1:15-17 (1995); Gao y Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection Of Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 179:280-85 (1991);

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Véase, p.ej., Kay *et al.*, "In Vivo Gene Therapy Of Hemophilia B: Sustained Partial Correction In Factor IX-Deficient Dogs", *Science*, 262:117-19 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", *Science*, 256:808-13 (1992).

4) Transferencia de ADN mediada por virus de ADN. Tales virus de ADN incluyen los adenovirus (preferiblemente los vectores basados en Ad-2 o Ad-5), herpesvirus (preferiblemente los vectores basados en el virus herpes simple), y parvovirus (preferiblemente los vectores basados en parvovirus "deficientes" o no autónomos, más preferiblemente los vectores basados en virus adeno-asociados, y lo más preferiblemente los vectores basados en AAV-2). Véase, p.ej., Ali *et al.*, "The Use Of DNA Viruses As Vectors For Gene Therapy", *Gene Therapy*, 1:367-84 (1994); la patente de Estados Unidos 4.797.368, incorporada en esta memoria como referencia, y la patente de Estados Unidos 5.139.941, incorporada en esta memoria como referencia.

La elección de un sistema de vector particular para transferir el gen de interés dependerá de una diversidad de factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células seleccionadas como objetivo. Aunque los vectores retrovirales se han estudiado y utilizado de forma exhaustiva en varias aplicaciones de terapia génica, estos vectores en general son inadecuados para infectar células que no se dividen. Además, los retrovirus pueden provocar oncogenicidad. Sin embargo, los avances recientes en el campo de los vectores lentivirales pueden evitar algunas de estas limitaciones. Véase Naldini *et al.*, *In vivo* gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector, *Science* 272:263-7 (1996).

Los retrovirus a partir de los cuales se pueden derivar los vectores plasmídicos retrovirales mencionados anteriormente incluyen, pero sin limitación, el virus de la leucemia murina de Moloney, virus de necrosis esplénica, retrovirus tales como el virus de sarcoma de Rous, virus de sarcoma de Harvey, virus de la leucosis aviar, virus de la leucemia del gibón, virus de la inmunodeficiencia humana, adenovirus, virus de sarcoma mieloproliferativo, y virus de tumor mamario. En una realización, el vector plasmídico retroviral deriva del virus de la leucemia murina de Moloney.

Los adenovirus tienen la ventaja de que tienen un amplio espectro de hospedadores, pueden infectar células en reposo o diferenciadas definitivamente, tales como neuronas o hepatocitos, y no parecen ser esencialmente oncogénicos. Véase, p.ej., Ali *et al.*, anteriormente mencionado, pág. 367. Los adenovirus no parecen integrarse en el genoma del hospedador. Debido a que existen de forma extracromosómica, el riesgo de mutagénesis por inserción se reduce enormemente. Ali *et al.*, anteriormente mencionado, pág. 373.

Los virus adeno-asociados exhiben ventajas similares a los vectores basados en adenovirus. Sin embargo, los VAAs exhiben una integración específica de sitio en el cromosoma 19 humano (Ali *et al.*, anteriormente mencionado, pág. 377).

En una realización preferida, el ADN que codifica los secretagogos de insulina polipeptídicos de esta invención se usa en la terapia génica de trastornos tales como la diabetes.

Según esta realización, la terapia génica con ADN que codifica los secretagogos de insulina polipeptídicos o mutéfnas de esta invención se proporciona a un paciente que lo necesita, de manera concurrente con, o inmediatamente después del diagnóstico.

El técnico experto apreciará que se puede usar cualquier vector de terapia génica adecuado que contenga los secretagogos de insulina polipeptídicos, ADN o ADN de un fragmento, derivado o variante de los secretagogos de insulina polipeptídicos de acuerdo con esta realización. Las técnicas para construir tal vector son conocidas. Véase, p.ej., Anderson, W.F., "Human Gene Therapy," *Nature*, 392 25-30 (1998); Verma, L.M., y Somia, N., "Gene Therapy - Promises, Problems, and Prospects", *Nature*, 389 239-242 (1998). La introducción del vector que contiene el ADN de los secretagogos de insulina polipeptídicos en la localización seleccionada como objetivo se puede llevar a cabo mediante el uso de técnicas conocidas.

El vector incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, el LTR retroviral; el promotor de SV40; y el promotor de citomegalovirus (CMV) humano descrito en Miller, *et al.*, *Biotechniques*, 7(9): 980-990 (1989), o cualquier otro promotor (p.ej., promotores celulares tales como los promotores celulares eucarióticos que incluyen, pero sin limitación, los promotores de histonas, de pol III, y de  $\beta$ -actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, los promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK), y los promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado será evidente para los expertos en la técnica a partir de las enseñanzas contenidas en esta memoria.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención está bajo control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, pero sin limitación, promotores adenovirales, tales como el promotor tardío principal adenoviral; o promotores heterólogos, tales como el promotor de citomegalovirus (CMV); el promotor del virus sincitial respiratorio (VSR); promotores inducibles, tales como el promotor MMT, el promotor de metalotioneína; promotores de choque térmico; el promotor de albúmina; el promotor de ApoA1; promotores de globina humana; promotores de timidina quinasa virales, tal como el promotor de timidina quinasa de herpes simple; LTRs retrovirales (que incluyen los LTRs retrovirales modificados descritos anteriormente); el promotor de  $\beta$ -actina; y el promotor de la hormona del crecimiento humana. El promotor también puede ser el promotor nativo que controla el gen que codifica el polipéptido.

El vector plasmídico retroviral se emplea para transducir las líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Los ejemplos de células de empaquetamiento que se pueden transfectar incluyen, pero sin limitación, las líneas celulares PE501, PA317,  $\Psi$ -2,  $\Psi$ -AM, PA12, T19-14X, VT-19-17-H2,  $\Psi$ CRE,  $\Psi$ CRIP, GP+E-86, GP+envAm12, y DAN, como se describen en Miller, *Human Gene Therapy*, 1: 5-14 (1990), que se incorpora en esta memoria como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células de empaquetamiento por cualquier medio conocido en la técnica. Tales medios incluyen, pero sin limitación, la electroporación, el uso de liposomas, y la precipitación con  $\text{CaPO}_4$ . Como alternativa, el vector plasmídico retroviral se puede encapsular en un liposoma, o acoplarlo a un lípido, y administrarlo después al hospedador. La línea celular productora genera partículas infecciosas de vectores retrovirales que incluyen la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) los polipéptidos. Tales partículas de vectores retrovirales se pueden emplear después para transducir células eucarióticas, *in vitro* o *in vivo*. Las células eucarióticas transducidas expresarán la(s) secuencia(s) de ácido nucleico que codifica(n) el polipéptido. Las células eucarióticas que se pueden transducir incluyen, pero sin limitación, células precursoras embrionarias no humanas, células de carcinoma embrionario, así como células precursoras hematopoyéticas no humanas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células epiteliales bronquiales.

Una aproximación diferente a la terapia génica es la "terapia transcariótica" en la que las células del paciente se tratan *ex vivo* para inducir en los genes cromosómicos inactivos la producción de la proteína de interés tras la reintroducción en el paciente. La terapia transcariótica supone que el individuo tiene un complemento normal de genes necesarios para la activación. La terapia transcariótica implica introducir un promotor u otra secuencia reguladora exógena capaz de activar los genes nacientes en el ADN cromosómico de las células del paciente *ex vivo*, cultivar y seleccionar las células productoras de proteína, y después reintroducir las células activadas en el paciente con el propósito de que se establezcan completamente. Las células "con el gen activado" producen después la proteína de interés durante cierto período de tiempo significativo, quizás durante toda la vida del paciente. Las patentes de EE.UU. n°s 5.641.670 y 5.733.761 describen con detalle este concepto, y se incorporan en esta memoria como referencia en su totalidad.

Para que esta invención se pueda entender mejor, se exponen los siguientes ejemplos. Estos ejemplos tienen fines ilustrativos únicamente, y no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera. Todas las publicaciones mencionadas en esta memoria se incorporan como referencia en su totalidad.

#### Ejemplo 1

##### Protocolo para el Aislamiento de Islotes de Rata

Se usaron ratas Sprague Dawley (275-320 g) como fuente de islotes donantes. Brevemente, el páncreas se llenó con 10 ml de Liberasa RI (Boehringer Mannheim) reconstituida fría, se recogió y se incubó con 5 ml adicionales de disolución de enzima en baño de agua durante 30 minutos. La suspensión de tejido se lavó dos veces con tampón FBS/Hanks frío al 10% (Gibco), se resuspendió en 8 ml de ficoll al 25% (Sigma) y después se colocaron capas de 5 ml de ficoll al 23%, 20% y 11%. Se extrajeron los islotes de la capa del 20% tras la centrifugación, se lavaron dos veces con tampón FBS/Hank frío al 10% y se resuspendieron en medio FBS/RPMI 1640 al 10% (Sigma).

## ES 2 307 534 T3

### Ejemplo 2

#### *Protocolo para el Análisis de la Elevación Inducida por el Polipéptido de los Niveles de Insulina en Ratas*

5 Se hacen ayunar ratas Wistar durante la noche (17 h) y después se anestesian con pentobarbital (0,1 ml/100 g de PC). Se inyecta glucosa (0,4 g/kg disuelta en un 1% de albúmina humana-solución salina) +/- péptido (disuelto en un 1% de albúmina humana-solución salina) de forma intravenosa en la vena de la cola.

10 Se extrae sangre del ojo a las ratas 1 minuto después de la inyección, y se analiza la concentración de insulina en 50-100 µl de plasma con el equipo de RIA de Linco (Linco Research, Inc., St. Charles, MO).

### Ejemplo 3

#### *Protocolo para la Determinación del Efecto de los Polipéptidos sobre la Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal en Ratas*

20 Se hacen ayunar ratas Wistar durante la noche y después se anestesian con pentobarbital. Se extrajo sangre del ojo a las ratas (tiempo cero) y se inyectó el péptido (en un 1% de albúmina humana) en la vena de la cola. Cinco minutos después se inyectó 1 g/kg de glucosa (en solución salina) de forma intraperitoneal, y se extrajo sangre del ojo a las ratas después de 15, 30 y 60 minutos. Se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa mediante el uso del autoanalizador Technicon Axon, sección Bayer Diagnostics de Bayer Corporation, Tarrytown NY, utilizado mediante el uso del método nº SM4-2143F90 "Glucosa".

### Ejemplo 4

#### *Protocolo para la Determinación del Efecto de los Péptidos sobre la Retención Intestinal de Agua en Ratas*

30 Se hicieron ayunar ratas macho durante 24 horas, y sus botellas de agua se retiraron durante 2 - 3 horas antes del comienzo del experimento. Se inyectó de manera subcutánea péptido o solución salina en las ratas conscientes. Las ratas se sacrificaron con CO<sub>2</sub> 10 minutos después de la administración de la dosis, y el intestino delgado se extrajo y se pesó (1). El intestino se abrió, el agua de la luz se absorbió con papel de filtro, y se volvió a pesar el intestino (2). La cantidad de agua intestinal (g) = peso (1) - peso (2).

### Ejemplo 5

#### *Metodología de Síntesis de Péptidos*

40 Se siguió el siguiente procedimiento general para sintetizar algunos de los péptidos de la invención. La síntesis peptídica se llevó a cabo mediante la estrategia FMOC/t-Butilo (Peptide Synthesis Protocols (1994), volumen 35 de Michael W. Pennington y Ben M. Dunn) en condiciones de flujo continuo mediante el uso de resinas de PEG-Poliestireno de Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubinga, Alemania). Al finalizar la síntesis, los péptidos se escinden de la resina y se desprotegen mediante el uso de TFA/DTT/H<sub>2</sub>O/Triisopropil silano (88/5/5/2). Los péptidos precipitaron de la mezcla de escisión mediante el uso de éter dietílico frío. El precipitado se lavó tres veces con éter frío y después se disolvió en ácido acético al 5% antes de la liofilización. Los péptidos se comprobaron mediante cromatografía en fase inversa en una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC, Inc., Wilmington, NC) en un sistema ALLIANCE® de Waters (Waters Corporation, Milford, MA) mediante el uso de agua/acetonitrilo con un 3% de TFA en forma de un gradiente del 0% al 100% de acetonitrilo, y mediante espectrometría de masas MALDI en un espectrómetro de masas MALDI VOYAGER DE™ (modelo 5-2386-00, PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Se añadió una muestra de péptido en tampón Matrix (50/50 dH<sub>2</sub>O/acetonitrilo con un 3% de TFA) a tampón Matrix 1/1. Los péptidos que no cumplen los criterios de pureza de >95% se purifican mediante cromatografía en fase inversa en un sistema de HPLC Delta Prep 4000 de Waters (Waters Corporation, Milford, MA).

### Ejemplo 6

#### *Clonado de péptidos*

60 La expresión recombinante de VIP se ha intentado previamente con diversos resultados. Simoncsits *et al* (Eur. J. Biochem. 178: 343-350, (1988)) expresó Leu<sup>17</sup>, Gly<sup>29</sup>-VIP o Leu<sup>17</sup>Gly<sup>29</sup> Lys<sup>30</sup> Arg<sup>31</sup>-VIP como una fusión C-terminal a la parte N-terminal del gen de β-galactosidasa de *E. coli* en *E. coli*. La eliminación de la metionina de la posición 17 elimina un sitio de escisión de CNBR. La adición C-terminal de Gly o Gly-Lys-Arg se diseñó para la amidación C-terminal *in vivo* potencial mediante PAMasa mamífera. Tras la escisión mediante CNBR de las proteínas de fusión en la metionina introducida en posición N-terminal de los mutantes de VIP, los mutantes de VIP libres se purificaron y mostraron poseer actividades similares a las del VIP nativo, aunque las actividades se midieron solamente a las concentraciones de saturación de los péptidos. Raingeaud *et al* (Biochimie 78: 14-25 (1996)) expresó VIP en forma



de fusiones C-terminales poliméricas a glutatión S-transferasa (GST) en *E. coli*. Los péptidos de VIP poliméricos o monoméricos libres se liberaron tras escisiones secuenciales mediante Factor Xa e hidroxilamina. La necesidad de una escisión en dos etapas condujo a ineficacia y a una mezcla de productos. Los péptidos de VIP poliméricos o monoméricos producidos mediante este método fueron menos activos que el VIP nativo. Una versión mejorada de la construcción mediante el uso solamente de escisión con Factor Xa produjo un mutante de VIP con una extensión C-terminal de siete residuos que también fue menos activo que el VIP nativo (Ottavi *et al.*, *Biochimie* 80: 289-293 (1998)). No se ha informado de la expresión de PACAP hasta la fecha. Para establecer un método robusto para la expresión de PACAP, VIP, y sus mutantes, sus códigos genéticos se clonaron en posición C-terminal respecto de GST con un único sitio de reconocimiento para el Factor Xa que separaba el péptido monomérico y GST. El gen que codifica el sitio de reconocimiento para el Factor Xa fusionado a la secuencia de ADN del péptido a producir se ha sintetizado mediante la hibridación de dos fragmentos de ADN monocatenarios solapantes (70-90meros), que contienen un sitio para la enzima de restricción Bam HI o Xho I inmediatamente en posición 5' respecto de la secuencia de ADN del gen a clonar, seguido por la síntesis de ADN de las hebras opuestas por medio del fragmento grande de la ADN polimerasa I (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD). La secuencia de ADN elegida para cada gen se basó en la traducción inversa de la secuencia de aminoácidos diseñada para cada péptido. En algunos casos, el gen que codifica el péptido se genera mediante mutagénesis por PCR (Picard, V, *et al.*, *Nucleic Acids Res* 22: 2587-91 (1994); Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) de un gen ya producido mediante el método descrito anteriormente. El producto bicatenario se digiere después con Bam HI y Xho I y se liga en pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech), que también se ha escindido mediante Bam HI y Xho I. Las secuencias de ADN de los genes de los péptidos clonados se enumeran en la Figura 8.

Por ejemplo, cuando las secuencias de ADN de ID SEC N°s: 54, 55 y 56 (que no son secuencias polipeptídicas proporcionadas por la invención) se clonan en pGEX-6P-1, las siguientes secuencias polipeptídicas se expresan en forma de fusiones con glutatión S-transferasa (GST):

PACAP38: IEGRHSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK (ID SEC N°:2)

VIP: IEGRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLN SILN (ID SEC N°:1)

R3P3: IEGRHSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLN DLKKGGT (ID SEC N°:8)

Se muestra un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene la fusión GST-péptido en la Figura 3.

## Ejemplo 7

### Expresión Recombinante de Péptidos y Purificación

Se cultivaron células BL21 (Stratagene) transformadas con los plásmidos que contenían la fusión GST-péptido a 37°C hasta que la DO<sub>600</sub> alcanzó 0,6 a 1,0, y se realizó la inducción mediante IPTG 1 mM (Life Technologies) durante 2 horas a 37°C. Se centrifugaron 2 L de las células a 7.700 g durante 15 minutos, se pesaron y se almacenaron a -20°C durante al menos 3 horas. El sedimento celular congelado se resuspendió en 100 mL de PBS helado con 250 µl de mezcla de inhibidor de proteasas (n° cat. P-8465, Sigma Chemical) por gramo de células, se sometió a sonicación a 3x durante 1 minuto con paradas de 15 segundos. Los restos celulares se centrifugaron a 10.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante se mezcló con 2 mL de resina Glutatión-Sefarosa 4B al 50% (Pharmacia) en un agitador durante la noche a 4°C. Las resinas se centrifugaron a 1.500 g durante 15 minutos, se introdujeron en columnas vacías de cromatografía Poly-Prep (Bio-Rad), se lavaron con 30 mL de PBS seguido de 10 mL de tampón de Factor Xa (CaCl<sub>2</sub> 1 mM, NaCl 100 mM, y Tris-HCl 50 mM, pH 8,0). El péptido se escindió de la columna mediante 60 unidades de Factor Xa (Pharmacia) en 1 mL de tampón de Factor Xa durante la noche a 4°C, y se sometió a HPLC en C18 (Beckman System Gold), mediante el uso de un bucle de 2 mL y a un caudal de 2 mL/min con el siguiente programa: 10 minutos de tampón A (0,1% de TFA/H<sub>2</sub>O), 30 minutos de gradiente hasta el tampón B (0,1% de TFA/ACN), 10 minutos de tampón A, 10 minutos de gradiente, y 10 minutos de tampón A. Las fracciones de los picos (1 mL cada una) se recogieron y se cribaron mediante electroforesis en gel de Tricina-SDS al 10-20%. Las fracciones que contenían los péptidos de la Tabla 1 se mezclaron y se secaron. Los rendimientos típicos son de varios cientos de microgramos de péptidos libres por litro de cultivo de *E. coli*. Se ha demostrado que los péptidos recombinantes tienen las mismas actividades que sus versiones sintéticas.

La siguiente tabla contiene algunos polipéptidos seleccionados y polipéptidos de secuencias que no son parte de la invención producidos según el protocolo de síntesis de péptidos discutido anteriormente (Ejemplo 5), o de manera recombinante como se describe en el Ejemplo 7. Los péptidos producidos mediante el método recombinante se indican con una letra minúscula, "r", delante del código indicador del péptido. Los péptidos producidos tanto por medios recombinantes como sintéticos se indican mediante asteriscos tras sus n°s de péptido. Los péptidos R3P0 y R3P4 fueron informados por Bolin, *et al.* (Biopolymers 37:57-66 (1995); patente de EE.UU. 5.677.419).

## ES 2 307 534 T3

TABLA 1

<u>Péptido N°</u>	<u>Secuencia</u>	<u>ID SEC</u> <u>N°:</u>
R3P0	Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNIeAAKKYLNDLKKGGT-NH <sub>2</sub>	5
R3P1	Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT-NH <sub>2</sub>	6
R3P2	Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	7
rR3P3*	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	8
R3P4	Ac-HSDAVFTEN(CH <sub>3</sub> O-Y)TKLRKQNIeAAKKYLNDLKK-NH <sub>2</sub>	9
R3P5	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKK	10
R3P8	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKK-NH <sub>2</sub>	11
rR3P9*	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKGGT	12
R3P10	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLLNGGT	13
R3P11	HSDAVFTDNYTKLRKQLAAKKYLNDILNGGT	14
R3P12*	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKGGT	15
R3P13	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKK-NH <sub>2</sub>	16
R3P14	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNDLKKGGT	17
R3P19	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGTSWCEPGWCR	18
R3P20	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNDIKKGGT	19
R3P21	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDIKKGGT	20
R3P22	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNSIKKGGT	21
R3P24	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKNGGT	22
R3P25	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNSIKKGGT	23
R3P26	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKGGT	24
R3P29	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDIKNGGT	25
R3P30	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNSIKNGGT	26
R3P31	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKGG	27
R3P32	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKG	28
rR3P33*	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKK	29
R3P34	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKQ	30
R3P35	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKNQ	31
R3P36	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDIKKKRY	32
rR3P41	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKK	33
rR3P42	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKN	34
rR3P43	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILK	35
rR3P44	HSDAVFTDNYTELKQMAVKKYLNSILN	36

ES 2 307 534 T3

5	rR3P45	HSDAVFTDNYTRLREQMAVKKYLNSILN	37
	rR3P46	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNSILN	38
	rR3P47	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSILN	39
	rR3P48	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNDILN	40
10	rR3P49	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKN	41
	rR3P50	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSILK	42
	rR3P51*	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKK	43
15	rR3P52	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKKRY	44
	rR3P53*	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKKR	45
	rR3P54	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKKK	46
20	rR3P55*	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKRY	47
	rR3P56	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKKRY	48
25	rR3P57	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKKR	49
	rR3P58	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKKK	50
	rR3P59	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKNKRY	51
30	rR3P60	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKK	52
	rR3P61	HSDAVFTDNYTRLRKQIAAKKYLQTIKK	53
35	R3P6	HSDGIFTESYSRYRKQMAVKKYLAALKKKRYKQRVKNK	57
	R3P7	HSDAVFTENYTRLRKQMAVKKYLNSLKK-NH <sub>2</sub>	58
	R3P15	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLSAVRHGQT-NH <sub>2</sub>	59
40	R3P16	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKQGGT-NH <sub>2</sub>	60
	R3P17	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKKYLAVRHG-NH <sub>2</sub>	61
	R3P18	SWCEPGWCRHSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKGGT	62
45	R3P23	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDILKGGT	63
	R3P27	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNDILNGGT	64
	R3P28	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNDILKGGT	65
50	R3P37	HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKKGGT	66
	R3P38	HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKK	67
55	R3P39	HSDGIFTDSYSRYRKQLAVKKYLAAVKK	68
	R3P40	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKK	69
	R3P62	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKK	70
60	R3P65	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKR	71
	R3P66	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY	72
	R3P67	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNTIKNKRY	73
65	R3P68	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKNKRY	74

ES 2 307 534 T3

	R3P69	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLQSIKNKRY	75
5	R3P70	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNTIKNKRY	76
	R3P71	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKRY	77
	R3P72	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLNTIKNKRY	78
10	R3P73	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLNSIKNKRY	79
	R3P74	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLNSIKNKRY	80
	R3P75	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAHKYLNTIKNKRY	81
15	R3P76	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKHYLNTIKNKRY	82
	R3P77	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKKR	83
	R3P78	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKKKR	84
20	R3P79	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKNKRY	85
	R3P80	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKR	86
25	R3P81	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKK	87
	R3P82	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKNKRY	88
	R3P83	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILKKRY	89
30	R3P84	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILKKR	90
	R3P85	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILKK	91
	R3P86	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNK	92
35	R3P87	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSILKKRY	93
	R3P88	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSILKKR	94
40	R3P89	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSILKK	95
	R3P92	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILNKRY	97
	R3P93	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILNKR	98
45	R3P94	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSILNK	99
	rR3P97	HSDAVFTDNYTRLRKQMACKKYLNSIKNKR	100
50	rR3P98	HSDAVFTDNYTRLRKQMADKKYLNSIKNKR	101
	rR3P99	HSDAVFTDNYTRLRKQMAEKKYLNSIKNKR	102
	rR3P100	HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLNSIKNKR	103
55	rR3P101	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIKNKR	104
	rR3P102	HSDAVFTDNYTRLRKQMAHKKYLNSIKNKR	105
	rR3P103	HSDAVFTDNYTRLRKQMAIKKYLNSIKNKR	106
60	rR3P104	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNSIKNKR	107
	rR3P105	HSDAVFTDNYTRLRKQMALKKYLNSIKNKR	108
	rR3P106	HSDAVFTDNYTRLRKQMAMKKYLNSIKNKR	109
65	rR3P107	HSDAVFTDNYTRLRKQMANKKYLNSIKNKR	110

ES 2 307 534 T3

5	rR3P108	HSDAVFTDNYTRLRKQMAPKKYLNSIKNKR	111
	rR3P109	HSDAVFTDNYTRLRKQMAQKKYLNSIKNKR	112
	rR3P110	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNSIKNKR	113
	rR3P111	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLNSIKNKR	114
10	rR3P112	HSDAVFTDNYTRLRKQMATKKYLNSIKNKR	115
	rR3P113	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKNKR	116
	rR3P114	HSDAVFTDNYTRLRKQMAWKKYLNSIKNKR	117
15	rR3P115	HSDAVFTDNYTRLRKQMAYKKYLNSIKNKR	118
	rR3P116	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIANKR	119
20	rR3P117	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSICNKR	120
	rR3P118	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIDNKR	121
	rR3P119	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIENKR	122
25	rR3P120	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIFNKR	123
	rR3P121	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIGNKR	124
	rR3P122	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIHNKR	125
30	rR3P123	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIINKR	126
	rR3P124	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIMNKR	127
35	rR3P125	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSINNKR	128
	rR3P126	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIPNKR	129
	rR3P127	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIQNKR	130
40	rR3P128	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIRNKR	131
	rR3P129	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSISNKR	132
45	rR3P130	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSITNKR	133
	rR3P131	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIVNKR	134
	rR3P132	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIWNKR	135
50	rR3P133	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIYNKR	136
	rR3P134	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNAR	137
	rR3P135	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNCR	138
55	rR3P136	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNDR	139
	rR3P137	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNER	140
	rR3P138	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNFR	141
60	rR3P139	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNGR	142
	rR3P140	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNHR	143
65	rR3P141	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNIR	144
	rR3P142	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNLR	145

ES 2 307 534 T3

	rR3P143	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNMR	146
5	rR3P144	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNNR	147
	rR3P145	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNPR	148
	rR3P146	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNQR	149
10	rR3P147	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNRR	150
	rR3P148	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNSR	151
	rR3P149	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNTR	152
15	rR3P150	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNVR	153
	rR3P151	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNWR	154
20	rR3P152	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNYR	155
	rR3P153	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKA	156
	rR3P155	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKD	157
25	rR3P156	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKE	158
	rR3P157	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKF	159
	rR3P158	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKG	160
30	rR3P159	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKH	161
	rR3P160	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKI	162
35	rR3P161	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKK	163
	rR3P162	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKL	164
	rR3P163	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKM	165
40	rR3P164	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKN	166
	rR3P165	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKP	167
	rR3P166	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKQ	168
45	rR3P167	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKS	169
	rR3P168	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKT	170
50	rR3P169	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKV	171
	rR3P170	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKW	172
	rR3P171	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNKY	173
55	R3P172	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRYSWCEPGWCR	174
	R3P173	HSDAVFTDDYTRLRKEVAAKKYLESIKDKRY	175
60	PAC1	ESDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	176
	PAC2	HKDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	177
	PAC3	HSKGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	178
65	PAC4	HSDKIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	179
	PAC5	HSDGKFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	180

## ES 2 307 534 T3

	PAC6	HSDGIKTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	181
5	PAC7	HSDGIFKDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	182
	PAC8	HSDGIFTKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	183
	PAC9	HSDGIFTDKYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	184
10	PAC10	HSDGIFTDSKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	185
	PAC11	HSDGIFTDSYKRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	186
	PAC12	HSDGIFTDSYSEYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	187
15	PAC13	HSDGIFTDSYSRKRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	188
	PAC14	HSDGIFTDSYSRYEKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	189
20	PAC15	HSDGIFTDSYSRYREQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	190
	PAC16	HSDGIFTDSYSRYRKKMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	191
	PAC17	HSDGIFTDSYSRYRKQKAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	192
25	PAC18	HSDGIFTDSYSRYRKQMKVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	193
	PAC19	HSDGIFTDSYSRYRKQMAKKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	194
	PAC20	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVEKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	195
30	PAC21	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKEYLA AVL-NH <sub>2</sub>	196
	PAC22	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKKLA AVL-NH <sub>2</sub>	197
35	PAC23	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYKA AVL-NH <sub>2</sub>	198
	PAC24	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLKAVL-NH <sub>2</sub>	199
	PAC25	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAKVL-NH <sub>2</sub>	200
40	PAC26	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AKL-NH <sub>2</sub>	201
	PAC27	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVK-NH <sub>2</sub>	202
45	rR3P174	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLN SIKNRI	322
	rR3P175	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLN SIKNRI	323
	rR3P176	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLN SIKNRI	324
50	rR3P177	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLN SIKNRI	325
	rR3P178	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLN SIKNRI	326
	rR3P179	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLN SIPNRI	327
55	rR3P180	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLN SIPNRI	328
	rR3P181	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLN SIPNRI	329
60	rR3P182	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLN SIPNRI	330
	rR3P183	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLN SIPNRI	331
	rR3P184	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLN SIQNRI	332
65	rR3P185	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLN SIQNRI	333
	rR3P188	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLN SIQNRI	334

rR3P187	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIQNRI	335
rR3P188	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKYLNSIQNRI	336
rR3P189	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKKYLNSIRNRI	337
rR3P190	HSDAVFTDNYTRLRKQMAGKKYLNSIRNRI	338
rR3P191	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKKYLNSIRNRI	339
rR3P192	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIRNRI	340
rR3P193	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKYLNSIRNRI	341

#### Ejemplo 8

##### *Secreción de insulina de islotes de rata*

El péptido R3P3 (0,1-100 nM) estimula la secreción de insulina de islotes de rata aislados de una manera dependiente de glucosa. Estos estudios comparan los efectos sobre las células de los islotes del péptido R3P3 y GLP-1.

Los islotes de rata se aislaron y se trataron con GLP-1 o R3P3 con glucosa 3 ó 8 mM en el medio, de acuerdo con el protocolo de islotes de rata descrito anteriormente en el Ejemplo 1. Como se muestra en las Figuras 4A-4B, el péptido R3P3, que no es parte de la presente invención, incrementa significativamente la liberación de insulina de los islotes de una manera dependiente de la concentración, y su efecto es similar al de GLP-1, un secretagogo de insulina conocido.

#### Ejemplo 9

##### *Respuesta a insulina y glucosa in vivo*

Como se muestra en las Tablas 2 y 3 más adelante, los polipéptidos que activan el receptor R3 también potencian el incremento inducido por glucosa de los niveles plasmáticos de insulina en comparación con la glucosa sola. Este incremento de la insulina provoca una disminución concomitante de la glucosa plasmática.

De acuerdo con el protocolo del Ejemplo 2 anterior, se anestesiaron ratas Wistar sometidas a ayuno durante la noche con pentobarbital; se les inyectó i.v. glucosa ± péptido y se extrajo sangre del ojo después de 1 minuto. N=12 ratas/grupo. El gráfico de la Figura 5 muestra que el polipéptido R3P3, que no se proporciona en la presente invención, provoca un incremento de la eliminación de glucosa que acompaña al incremento de la secreción de insulina. El péptido o vehículo se administró i.v., seguido de una carga de glucosa administrada i.p. de acuerdo con el Ejemplo 3. La glucosa plasmática se monitorizó a lo largo del período de tiempo indicado. Como se muestra en el gráfico, R3P3 aceleró notablemente la eliminación de la glucosa sanguínea.

#### Ejemplo 10

##### *Efectos secundarios de diarrea*

Como se describió en el protocolo del Ejemplo 4 anterior, a las ratas sometidas a ayuno se les inyectó s.c. el péptido indicado (5 nmol/kg o 22-24 nmol/kg). Cinco minutos después de la inyección, se administraron 0,3 ml de agua p.o. Cinco minutos después de la dosis de agua, los animales se sacrificaron y se determinó el contenido de agua del intestino delgado. Como se muestra en la Figura 6, las inyecciones de VIP a las dos dosis provocaron un incremento notable del contenido de agua de la luz del intestino delgado respecto del control de vehículo (solución salina). A la dosis más elevada, los péptidos R3 solamente provocaron un incremento muy pequeño (es decir, aproximadamente del 10%) en comparación con VIP. A la dosis de 5 nmol/kg, los péptidos no produjeron ningún cambio en el contenido de agua del intestino delgado. El grado de retención de agua se usó como índice de la activación de R2 *in vivo*.



## Ejemplo 11

*Efecto de los Péptidos sobre la Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal en Ratas*

Se sometió a ayuno a ratas Wistar durante la noche y después se anestesiaron con pentobarbital. Se extrajo sangre del ojo a las ratas (tiempo cero) y se inyectó el péptido (en un 1% de albúmina humana) de forma subcutánea. Cinco minutos después se inyectó 1 g/kg de glucosa (en solución salina) de forma intraperitoneal, y se extrajo sangre del ojo a las ratas después de 30 minutos. Las concentraciones plasmáticas de glucosa se determinaron mediante el uso del autoanalizador Axon, y se muestran en la Figura 7.

La Figura 7 muestra que la glucosa plasmática se elevó hasta 160 mg/dl por encima de la basal (100 mg/dl) en las ratas tratadas con vehículo 30 minutos después de la IPGTT (prueba de tolerancia a la glucosa IP). En las ratas a las que se inyectaron los péptidos R3P3, R3P12 y R3P13 que no son parte de la presente invención, esta elevación de la glucosa plasmática se redujo de manera significativa, lo que confirma el efecto de producción de insulina. A 1 nmoles/kg s.c. el efecto de disminución de la glucosa de cada péptido fue similar al observado con una dosis equivalente de GLP-1.

## Ejemplo 12

*Polipéptidos secretores de insulina dependiente de glucosa*

La Tabla 2 contiene una lista de los péptidos que estimularon la liberación de insulina *in vivo* en el ensayo IPGTT, o *in vitro* por medio del ensayo de islotes de rata. Como muestran los datos, los péptidos incrementan la liberación de insulina mediada por glucosa *in vivo* e *in vitro*.

Insulina plasmática: Los datos se expresan como % de la insulina plasmática un minuto después del IVGTT (0,4 g/kg de glucosa) con solución salina, 0,1 nmol/kg de P51, P55, P60, P66 ó 1 nmoles/kg de los otros péptidos que incluyen los péptidos que no son parte de la presente invención en ratas Wistar. La sangre se extrajo del ojo y la insulina se midió con el equipo de RIA de insulina de ratas (Linco Research, Inc, St. Charles, MO).

Glucosa plasmática: Los datos se expresan como % del vehículo de área de glucosa plasmática bajo la curva después del IPGTT (1 g/kg de glucosa) tras el tratamiento con una dosis de 1 nmol/kg del péptido. Se ha informado que PACAP27 induce la secreción de insulina pero no afecta a las concentraciones plasmáticas de glucosa (Filipsson, K. *et al.*, *J. Clin. Endocrin. & Metabolism* 82: 3093-3098 (1997)). Los presentes inventores han demostrado por primera vez que esto se debe a que los efectos de R2 y R3 sobre la glucosa tienden a contrarrestarse entre sí. El agonista selectivo de R2 [K15, R16, L27]VIP(1-7)/GRF(8-27) (Gourlet, P. *et al.*, *Peptides* 18:1539-45 (1997)), definido como R2P1, incrementa la concentración plasmática de glucosa un 14%, mientras los agonistas selectivos de R3 disminuyen la concentración plasmática de glucosa un -20%. Por lo tanto, la selectividad por R3 parece ser un atributo deseable para los medicamentos que se van a emplear para llevar a cabo una reducción de la glucosa sanguínea, para el tratamiento de la diabetes tipo 2.

Liberación de insulina de los islotes: Se aislaron islotes de ratas Sprague-Dawley como se describió en el Ejemplo 1, y se trataron con vehículo o con el péptido especificado (10 nM) durante 2 horas. La concentración de insulina en el medio se midió con el equipo de RIA de insulina de rata de Linco. La concentración de glucosa en el medio fue 8 mM. Los datos se expresan como % de la [insulina] en glucosa 8 mM sola. No se observaron incrementos inducidos por el polipéptido de la concentración de insulina con glucosa 3 mM; así, la actividad de liberación de insulina de estos polipéptidos es dependiente de la glucosa. Se debería indicar que la siguiente Tabla incluye datos de polipéptidos que no son parte de la presente invención.

TABLA 2

Péptido	Insulina plasmática (% de la basal)	Glucosa plasmática (% de la basal)	Liberación de insulina de los islotes (% de la basal)
		i.v.	s.c.
PACAP27	320		186
R2P1	216	114	

## ES 2 307 534 T3

	R3P0		77		264
	R3P1	480	73		250
5	R3P3	361	77	72	275
	R3P9				221
	R3P10				174
10	R3P12	302		76	324
	R3P13	465		77	170
15	R3P19	285			
	R3P36	255	73	78	
	P51	259			
20	P55	208			
	P60	283			
	R3P66	388		82	184
25	R3P77	388			
	R3P80	360			
30	R3P81	302			

### Ejemplo 13

#### 35 *Composición farmacéutica - Formulación IV*

Se produce una formulación inyectable estéril a partir de 4 mg de un polipéptido de ID SEC N°: 72 y 1 litro de solución salina estéril mediante el uso de un proceso de fabricación bien conocido en la técnica.

40

### Ejemplo 14

#### 45 *Composición farmacéutica - Formulación IV*

Se produce una formulación inyectable estéril que no es parte de la presente invención a partir de 400 mg de un polipéptido de ID SEC N° 174 y 1 litro de solución salina estéril, mediante el uso de un proceso de fabricación bien conocido en la técnica.

50

### Ejemplo 15

#### 55 *Efecto de PACAP27, VIP y agonistas peptídicos selectivos de receptores PACAP sobre el ritmo cardíaco en perros conscientes*

##### *Protocolo*

Se colocaron perros Beagle en un cabestrillo en el que habían sido entrenados para estar de pie hasta 3 horas. El manguito del monitor del ritmo cardíaco se colocó alrededor de la cola del perro.

60

Se inyectó solución salina en la vena cefálica y se monitorizó el ritmo cardíaco cada 2 minutos para establecer el valor inicial. Después de 10 minutos, se inyectó el péptido, lo que incluye los péptidos que no son parte de la invención, y se monitorizó el ritmo cardíaco cada 2 minutos durante los 20 minutos siguientes. Si el ritmo cardíaco era normal en ese momento, se administraba una dosis mayor y se monitorizaba el ritmo cardíaco durante 20 minutos. El área bajo la curva (ABC) durante los primeros 10 minutos de cambio del ritmo cardíaco inducido por el polipéptido se representó como el % respecto del ABC con vehículo frente a la concentración de polipéptido. PACAP27 y el agonista selectivo de R1 maxadilán (Moro, O. J. Biol. Chem. 272:966-970 (1997)) poseen una potencia similar en el incremento del ritmo cardíaco. VIP, que activa tanto R2 como R3 pero no R1, el agonista selectivo de R2 R2P1, y los

65

agonistas selectivos de R3 R3P0, R3P3, R3P19, R3P36, R3P51 y R3P53, son al menos 10 veces menos potentes que PACAP27 o mazadilán. Así, el efecto cardiovascular de PACAP27 se puede atribuir principalmente a la activación de PACAP-R1. Todos los péptidos son agonistas completos en sus receptores respectivos con afinidades comparables. R3P0 es el análogo de Roche RO 25-1553 que se ha demostrado que exhibe una selectividad por PACAP-R3 de al menos 100 veces respecto de R1 y R2 (Gourlet *et al.*, Peptides 18:4030408 (1997)).

#### Ejemplo 16

##### SPA de AMP cíclico

Se colocaron células CHO que expresaban PACAP R3 en placas de 96 pocillos (Costar) a  $8 \times 10^4$  células/pocillo y se cultivaron a 37°C durante 24 horas en MEM + nucleósidos + glutamina (Gibco BRL), FBS del 10%, 100 µg/ml de Pen/Estrep, 0,3 mg/ml de glutamina, HEPES 1 mM, 0,5 mg/ml de Geneticina (Gibco BRL). Los medios se eliminaron y las placas se lavaron con PBS. Las células se incubaron con un péptido, en Hepes-PBS-BSA con 0,4 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja, 0,5 mg/ml de Bacitracina, IBMX 100 µM, durante 15 min a 37°C. Se cuantificó el AMP cíclico en los extractos celulares mediante el uso del sistema de análisis de cribado directo de SPA de AMPc (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ). Se ensayó la actividad de AMPc de los péptidos mostrados en la Tabla 3.

La Tabla 3 informa de los resultados del SPA de AMPc *in vitro* en células CHO transfectadas con PACAP-R2 o PACAP-R3. CE50 se define como la concentración del polipéptido a la que se alcanza el 50% de la actividad máxima de PACAP27. “NA” indica que no se registraron actividades detectables. La “selectividad por R3” deriva de la proporción de CE50 en R2 frente a CE50 en R3. La mayoría de los siguientes polipéptidos están diseñados basándose en VIP, que se ha demostrado que carece de actividad en R1 (Vaudry D. *et al.*, 2000, Pharmacological Reviews, 52: 269-324). Por lo tanto, se cree que estos polipéptidos no poseen actividad apreciable en R1. Los péptidos, y las secuencias que no son parte de la invención, diseñados basándose en VIP incluyen las ID SEC N°: 6-53, 62-65 y 70-175. La Tabla 3 incluye algunos péptidos que no son parte de la presente invención.

(Tabla pasa a página siguiente)

# ES 2 307 534 T3

TABLA 3

	Péptido	ID SEC Nº	CE50 en R2, nM	CE50 en R3, nM	Selectividad por R3
5	VIP	1	0,1	0,08	1,3
	R3P0	5	> 100	0,4	> 250
10	R3P1	6	> 100	2	> 50
	R3P2	7	> 1000	3	> 300
	R3P3	8	100	0,75	130
15	R3P5	10	200	7	30
	R3P8	11	2	1,4	1,5
	R3P9	12	40	2	20
20	R3P10	13	3	11	0,3
	R3P11	14	10	3	3
25	R3P12	15	> 100	0,5	> 200
	R3P13	16	163	5	33
	R3P14	17	50	17	3
30	R3P19	18	42	1,4	30
	R3P20	19	330	1,4	230
	R3P21	20	17	0,3	60
35	R3P22	21	38	1,6	24
	R3P24	22	45	1,3	34
	R3P25	23	15	0,7	20
40	R3P26	24	> 100	0,55	> 180
	R3P29	25	> 100	0,5	> 200
45	R3P30	26	20	0,4	50
	R3P31	27	> 100	0,3	> 300
	R3P32	28	84	0,4	200
50	R3P33	29	> 100	0,5	> 200
	R3P34	30	> 100	1,4	> 70
	R3P35	31	> 100	2,6	> 40
55	R3P36	32	> 90	0,4	> 200
	R3P41	33	8	0,08	100
60	R3P42	34	0,3	0,03	10
65					

# ES 2 307 534 T3

	R3P43	35	0,8	0,08	10
5	R3P44	36	8	1,3	6
	R3P45	37	NA	NA	
	R3P46	38	0,4	0,06	7
10	R3P47	39	0,7	0,12	6
	R3P48	40	1	0,13	8
	R3P49	41	8	0,27	30
15	R3P50	42	0,7	0,13	6
	R3P51	43	23	0,26	90
20	R3P52	44	> 100	0,4	> 250
	R3P53	45	500	0,2	2500
	R3P54	46	> 100	0,5	> 200
25	R3P55	47	50	0,17	280
	R3P56	48	40	0,4	100
	R3P57	49	42	0,23	190
30	R3P58	50	55	0,32	170
	R3P59	51	10	0,15	70
	R3P60	52	120	1	120
35	R3P61	53	110	0,8	140
	R3P6	57	220	80	3
40	R3P7	58	2	4	0,5
	R3P15	59	12	5	2
	R3P16	60	14	10	1,4
45	R3P17	61	9	4	2
	R3P18	62	NA	NA	
	R3P23	63	10	0,43	23
50	R3P27	64	6,4	0,8	8
	R3P28	65	8	7	1
55	R3P37	66	71	4	18
	R3P38	67	17	2,3	7
	R3P39	68	1	0,5	2
60	R3P40	69	1,4	0,7	2
	R3P62	70	180	1,8	100
	R3P65	71	80	0,6	130
65	R3P66	72	100	0,4	250
	R3P67	73	100	0,3	330

# ES 2 307 534 T3

	R3P68	74	130	0,5	260
	R3P69	75	90	0,5	190
5	R3P70	76	> 100	0,4	> 250
	R3P71	77	56	0,09	660
10	R3P72	78	> 100	0,16	> 600
	R3P73	79	50	0,3	170
	R3P74	80	90	0,6	150
15	R3P75	81	> 150	0,3	> 500
	R3P76	82	> 150	0,1	> 1500
	R3P77	83	200	0,4	500
20	R3P78	84	250	1,1	230
	R3P79	85	100	0,5	200
25	R3P80	86	88	0,44	200
	R3P81	87	50	0,5	100
	R3P82	88	10	0,4	23
30	R3P83	89	5	0,08	60
	R3P84	90	2,5	0,06	40
	R3P85	91	5	0,18	30
35	R3P86	92	90	0,8	110
	R3P87	93	0,6	0,2	3
40	R3P88	94	0,9	0,08	12
	R3P89	95	0,9	0,06	15
	R3P92	98	2	0,02	100
45	R3P93	98	6	0,14	40
	R3P94	99	9	0,09	100
	R3P98	101	NA	NA	
50	R3P99	102	40	1,0	40
	R3P100	103	10	0,3	30
55	R3P101	104	400	1,0	400
	R3P102	105	300	60,0	5
	R3P103	106	0,4	0,05	8
60	R3P104	107	100	0,2	500
	R3P105	108	1	0,3	3
	R3P106	109	2	0,1	20
65	R3P107	110	1000	200,0	5
	R3P108	111	1000	300,0	3

# ES 2 307 534 T3

	R3P109	112	1000	10,0	100
	R3P110	113	100	0,5	200
5	R3P111	114	1000	3,0	300
	R3P112	115	4	0,1	40
10	R3P113	116	3	0,3	10
	R3P114	117	20	2,0	10
	R3P115	118	300	6,0	50
15	R3P116	119	20	1,0	20
	R3P118	121	15	0,5	30
	R3P119	122	15	0,5	30
20	R3P120	123	10	0,2	50
	R3P121	124	50	1,0	50
25	R3P122	125	10	0,2	50
	R3P123	126	5	0,1	50
	R3P124	127	3	0,2	15
30	R3P125	128	60	2,0	30
	R3P126	129	200	1,0	200
	R3P127	130	300	0,5	600
35	R3P128	131	60	0,3	200
	R3P129	132	50	1,0	50
40	R3P130	133	40	1,0	40
	R3P131	134	20	0,3	70
	R3P132	135	10	0,2	50
45	R3P133	136	8	0,1	80
	R3P134	137	40	0,4	100
	R3P136	139	20	0,3	70
50	R3P137	140	30	0,3	100
	R3P139	142	20	0,4	50
	R3P140	143	15	0,3	50
55	R3P141	144	20	0,2	100
	R3P142	145	6	0,2	30
60	R3P143	146	6	0,2	30
	R3P144	147	300	3,0	100
	R3P145	148	50	0,5	100
65	R3P146	149	30	0,3	100
	R3P147	150	100	0,2	500

# ES 2 307 534 T3

	R3P148	151	30	0,3	100
	R3P149	152	40	0,5	80
5	R3P150	153	40	0,8	50
	R3P153	156	40	0,2	200
10	R3P155	157	40	0,4	100
	R3P156	158	100	1,0	100
	R3P157	159	50	0,3	170
15	R3P158	160	6	0,07	90
	R3P159	161	200	0,5	400
	R3P160	162	100	0,2	500
20	R3P161	163	60	0,2	300
	R3P162	164	20	0,1	200
25	R3P163	165	40	0,2	200
	R3P164	166	100	0,3	300
	R3P165	167	150	0,5	300
30	R3P166	168	50	0,1	500
	R3P167	169	300	1,0	300
	R3P168	170	60	0,2	300
35	R3P169	171	60	0,2	300
	R3P170	172	20	0,1	200
40	R3P171	173	80	0,4	200
	R3P172	174	77	2,6	29
	R3P173	175	NA	200	
45	PAC1	176	970	10	97
	PAC2	177	NA	34	
	PAC3	178	NA	NA	
50	PAC4	179	45	7	6
	PAC5	180	1,8	0,7	2
	PAC6	181	NA	NA	
55	PAC7	182	NA	NA	
	PAC8	183	43	47	1
60	PAC9	184	0,9	0,7	1
	PAC10	185	110	27	4
	PAC11	186	10	140	0,1
65	PAC12	187	150	3	50
	PAC13	188	3	0,5	6



# ES 2 307 534 T3

	PAC14	189	110	1,6	70
	PAC15	190	2,4	0,2	12
5	PAC16	191	0,2	0,2	1
	PAC17	192	0,25	0,15	1,6
10	PAC18	193	0,7	1,1	0,7
	PAC19	194	8	0,4	20
	PAC20	195	20	0,7	30
15	PAC21	196	2,5	0,24	10
	PAC22	197	2	15	0,1
	PAC23	198	170	13	13
20	PAC24	199	0,3	0,2	1,5
	PAC25	200	0,13	0,04	3
25	PAC26	201	0,25	0,3	1
	PAC27	202	1,5	1,1	1,4
	rR3P174	322	18	0,20	90
30	rR3P175	323	400	2,2	180
	rR3P176	324	300	2,0	150
	rR3P177	325	110	1,6	70
35	rR3P178	326	80	0,75	110
	rR3P179	327	230	1,5	150
40	rR3P180	328	> 100	6,7	> 20
	rR3P181	329	280	5,1	50
	rR3P182	330	280	3,2	90
45	rR3P183	331	> 150	5,4	> 30
	rR3P184	332	10	0,37	30
	rR3P185	333	180	4,5	40
50	rR3P186	334	70	1,6	44
	rR3P187	335	> 130	1,6	> 80
	rR3P188	336	150	2,2	70
55	rR3P189	337	1,3	0,04	30
	rR3P190	338	220	2,2	100
60	rR3P191	339	> 200	2,7	> 80
	rR3P192	340	40	0,60	60
	rR3P193	341	200	1,9	110
65					

## ES 2 307 534 T3

### Ejemplo 17

#### *Producción de anticuerpos policlonales*

5 Se llevó a cabo la síntesis del polipéptido Ac-CRKQVAAKKYLQSIKNKRY COOH en un sintetizador de péptidos 430A de Applied Biosystems mediante el uso de química fmoc con activación con HBTU de los aminoácidos. El péptido se escindió mediante el uso de una mezcla de un 84,6% de TFA, 4,4% de fenol, 4,4% de agua, 4,4% de tioanisol, y 2,2% de etanoditiol. El péptido bruto se purificó mediante el uso de una columna de fase inversa C18 con un gradiente de 0,1% de TFA/CH<sub>3</sub>CN. La determinación de la pureza se llevó a cabo en un espectrómetro de masas  
10 MALDI PerSeptive V Biosystems Voyager DE Pro. El residuo de cisteína se acopló a KLH mediante el equipo y el protocolo Inject Maleimide Activated mCKLH de Pierce (Pierce, Rockford, IL). Los conejos se inmunizaron mediante el uso del siguiente calendario de inmunización de antisuero policlonal:

15 Día 0 - Extracción de 10 ml para obtener el suero inicial

250 µg de cada péptido en 1 ml de emulsión de adyuvante completo de Freund,

20 0,1 ml/sitio X 10 sitios de forma subcutánea

Día 14 - Refuerzo de 250 µg de cada péptido en 1 ml de emulsión de adyuvante incompleto de Freund

25 0,1 ml/sitio X 10 sitios de forma subcutánea

Día 21 - Extracción de 35 ml

30 Día 35 - Refuerzo de 250 µg de cada péptido en 1 ml de emulsión de adyuvante incompleto de Freund

0,1 ml/sitio X 10 sitios de forma subcutánea

35 Día 42 - Extracción de 35 ml

Día 56 - Refuerzo de 250 µg de cada péptido en 1 ml de emulsión de adyuvante incompleto de Freund

40 0,1 ml/sitio X 10 sitios de forma subcutánea

Día 63 - Extracción de 35 ml

45 Día 77 - Refuerzo de 250 µg de cada péptido en 1 ml de emulsión de adyuvante incompleto de Freund

0,1 ml/sitio X 10 sitios de forma subcutánea

50 Día 84 - Extracción final

#### *Los anticuerpos se caracterizaron mediante el uso del siguiente protocolo*

55 Se revistió una placa Immulon III (DYNATECH LABORATORIES, INC, Chantilly, Virginia) con péptido P66 (intervalo de 0,3-100 ng) en 100 µl de tampón de revestimiento de EIA, 1,6 L de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M + 0,4 L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, de pH 9,5) durante 3 horas a temperatura ambiente (TA). La placa se impregnó con 100 µl de 5% de leche TBS Tween 20 (tris 10 mM de pH 8,0, NaCl 150 mM, 0,05% de Tween-20 (SIGMA P-1379)) durante 1 hora a TA y se lavó 3 veces con TBS Tween. Se añadió anticuerpo R3P66 al pocillo en 100 µl de un 5% de Bloto (TBS - Tween 20 + 5% de leche) durante 2 horas a TA seguido de un lavado con TBS Tween (se repite el lavado 5 veces). Se añadió anticuerpo secundario (conjugado de anticuerpo anti-conejo de cabra y fosfatasa alcalina de BioRad) al pocillo a una dilución 1:1000 en 100 µl de 5% de Bloto durante 1 hora. La placa se lavó 5 veces con TBS Tween. Se añadió fosfato de p-nitrofenilo (SIGMA 104-105) 0,5 mg/ml de tampón de sustrato (Dietanolamina 1 M, MgCl<sub>2</sub>\*6H<sub>2</sub>O 0,5 µM, pH 9,8 c/HCl) en 100 µl y se incubó a TA durante 1 hora a O/N. Se leyó la DO 405 de la placa en un SPECTRAMax 250  
65 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

Para determinar si los conejos produjeron anticuerpos hacia el péptido

Ac-CRKQVAACKYLQSIKNKRY-COOH de acuerdo con el ejemplo 17 reconoció el péptido R3P66 (ID SEC N° 72), se llevó a cabo el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA). Cuando los anticuerpos reconocen un péptido, se detecta una señal a DO405. La Figura 10 muestra que estos anticuerpos reconocen R3P66 pero no interaccionan con los péptidos homólogos PACAP-27 o VIP hasta una concentración de péptido de 30 µg.

Ejemplo 18

*Hiperreactividad de las vías respiratorias en el modelo de asma agudo en primates*

Los monos *Cynomolgus* macho (*Macaca fascicularis*) usados en este estudio se mantuvieron a una temperatura y humedad constantes, con un ciclo de luz de doce horas. Se alimentaron dos veces al día, excepto en los días de experimentación, cuando la alimentación se detuvo la noche antes del procedimiento. El agua estuvo disponible a voluntad en todo momento.

La hiperreactividad de las vías respiratorias (AHR) (valor inicial) se midió 1 semana antes de la exposición al antígeno de control (sin tratamiento), y de nuevo 24 h tras la exposición al antígeno. La hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por el antígeno se midió mediante una caída de la PC<sub>100</sub> (la concentración de metacolina necesaria para provocar un incremento del 100% de la resistencia pulmonar) a las 24 h en comparación con el valor inicial. Después de 2 semanas de descanso, se llevó a cabo otra medida del valor inicial de AHR. Una semana más tarde, los péptidos de esta invención se administraron en forma de un aerosol, 10 minutos antes de la exposición al antígeno. Después de 24 h se volvió a medir la AHR, y la caída de PC<sub>100</sub> con tratamiento se comparó con aquella sin tratamiento.

Procedimiento experimental. En cada día de experimentación los animales se anestesiaron con una mezcla quetamina/xilazina (70:12 mg kg<sup>-1</sup> a 0,1 ml kg<sup>-1</sup>) mientras estaban en su jaula. Mientras estaban inconscientes se llevaron al laboratorio de primates, en el que se colocaron en posición de decúbito supino en una manta de agua termostatzada en una camilla. Se aplicó una pomada oftálmica a cada ojo, y se nebulizaron 0,2 ml de lidocaína (2%) en la laringe y en el fondo de la garganta. Las mandíbulas se mantuvieron separadas mediante un separador de mandíbula, y se insertó un tubo endotraqueal de calibre 5,0 con manguito (con el extremo untado abundantemente con gel de xilocaína, 2%) con la ayuda de un laringoscopio. El animal se colocó después en una silla de retención especialmente diseñada de forma que el animal estaba en una posición ligeramente reclinada pero sentado en posición erguida, sujetado solamente por un collar alrededor del cuello. Una manta termostatzada con agua rodeaba al animal.

El tubo endotraqueal se conectó a un ventilador Harvard ajustado para proporcionar 30-35 respiraciones por minuto. El flujo de aire se midió mediante un neumotacógrafo Fleisch y la presión torácica se midió mediante un transductor de presión Validyne (como la diferencia entre la presión en el extremo distal del tubo ET y la presión atmosférica).

El neumotacógrafo y el Validyne se conectaron a un preamplificador y después a un analizador respiratorio MI<sup>2</sup>. Mediante el uso de las señales principales de flujo y presión, el analizador calculó la resistencia de las vías respiratorias y la distensibilidad (así como otros parámetros respiratorios diversos). Se llevó a cabo una medida inicial de 5-6 minutos para asegurar que las señales eran estables y que los valores de resistencia y distensibilidad estaban dentro de los límites reconocidos.

Exposición a antígenos: Esta fue una exposición por inhalación con *Ascaris suum*. El extracto suministrado de *Ascaris suum* se diluyó 10 veces con PBS para proporcionar una disolución de 1000 µg/ml. El aerosol se administró con un nebulizador de gotas Rainbow controlado a presión (Puritan-Bennett) conectado a un respirador Bird Mark 7A, ajustado para suministrar 15 respiraciones por minuto. Se administraron 30 respiraciones de antígeno, tras lo cual se monitorizó la broncoconstricción aguda durante 15 min.

Tras la finalización de la exposición se retiró al animal del ventilador, y cuando pudo respirar por sí mismo se liberó de la silla de retención y se colocó en posición de decúbito supino sobre la camilla. Cuando volvieron a aparecer los reflejos normales (parpadeo, deglución) junto con el tono muscular de las extremidades del animal se devolvió a su jaula.

Administración del péptido: Los péptidos en estudio se administraron mediante inhalación como se describió anteriormente. La siguiente lista de péptidos incluye péptidos que no son parte de la presente invención. Se diluyeron disoluciones de reserva de los péptidos con agua estéril para alcanzar una concentración de 0,5 µg/4 µl. A partir de las medidas previas se había demostrado que el nebulizador administra 4 µl/respiración, y se ajustó el número de respiraciones aplicado a cada animal para administrar la concentración final correcta desde el nebulizador. Para cada péptido, las concentraciones finales administradas fueron las siguientes:

R3P0 (ID SEC N°:5) - 0,6 µg/kg

R3P76 (ID SEC N°:82) - 3 µg/kg

R3PB2 (ID SEC N°:88) - 1,8 µg/kg

Exposición a metacolina: Se llevaron a cabo curvas de respuesta a dosis de metacolina para estudiar la hiperreactividad de las vías respiratorias. En el modelo agudo, esto se midió a +24 horas y se comparó con la reactividad 7 días antes del tratamiento. Se administró un aerosol de solución salina tamponada con fosfato (PBS) mediante el uso de un nebulizador como se describió anteriormente. El aerosol se administró durante 15 respiraciones y después se monitorizó la resistencia pulmonar durante diez minutos. Se preparó metacolina (Sigma) a una concentración de 100 mg/ml en PBS, y esta disolución de reserva se diluyó con PBS hasta un intervalo final de concentraciones de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml. Se administró metacolina (0,1 mg/ml, 15 respiraciones) seguido de otros diez minutos de monitorización. Se administraron dosis sucesivas de metacolina con un incremento de dosis semilogarítmico en cada etapa hasta que la resistencia pulmonar se dobló, o se hubo administrado la dosis máxima de metacolina (100 mg/ml). El valor inicial de resistencia (cero %) se consideró la resistencia alcanzada tras la administración de PBS. El incremento de la resistencia pulmonar (%) y las dosis de metacolina se introdujeron en una hoja de cálculo y se calculó  $PC_{100}$  (la dosis de metacolina que provoca un incremento del 100% de la resistencia) a partir de un gráfico de la dosis frente a la resistencia. Estos valores se convirtieron en valores de  $\log_{10}$ . El delta  $PC_{100}$  (valor a +24 h - valor inicial) para el estudio de tratamiento se comparó con el del estudio de control.

La Tabla 4 muestra los datos de  $PC_{100}$  para los tres péptidos. Como demuestran los datos, los péptidos son eficaces contra la hiperreactividad de las vías respiratorias inducida por antígeno, y así pueden ser una terapia potencial para el asma. Se debería indicar que R3P0 (ID SEC N°: 5) y R3P82 (ID SEC N°: 88) no son parte de la presente invención.

TABLA 4

*Datos de  $PC_{100}$  para los tres estudios con péptidos*

	<u>Péptido (dosis)</u>					
	<u>R3P0 (0,6 µg/mg)</u>		<u>R3P76 (3,0 µg/kg)</u>		<u>R3P82 (1,8 µg/kg)</u>	
	Control	Tratado	Control	Tratado	Control	Tratado
<u>Delta <math>\log_{10} PC_{100}</math></u>						
N	4	4	5	5	4	4
Media*	-0,325	-0,150	-0,468	+0,047	-0,567	-0,067
DE	0,177	0,152	0,128	0,253	0,361	0,329
P (Tratado frente a Control)	0,240		0,031		0,087	
% de inhibición de la AHR inducida	54		100		88	

\*Cuanto mayor sea el valor negativo, más hiperreactivo se hace el animal.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la anterior memoria descriptiva se incorporan aquí como referencia. Diversas modificaciones o variaciones de las composiciones y los métodos de la invención descritos serán evidentes para los expertos en la técnica sin apartarse del alcance y del espíritu de la invención. Aunque la invención se ha descrito con respecto a realizaciones específicas preferidas, se debería entender que la invención tal como se reivindica no se debería limitar excesivamente a tales realizaciones específicas. De hecho, se pretende que diversas modificaciones de los modos anteriormente descritos de llevar a cabo la invención, que son obvios para los expertos en el campo de la biología molecular o de campos relacionados, estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar mediante el uso nada más que de experimentación rutinaria, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descritas en esta memoria. Se pretende que tales equivalentes estén abarcados por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en las ID SEC N°s: 47, 72-82 y 85.

2. Un polinucleótido que codifica una secuencia polipeptídica de la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo.

3. Un vector que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2.

4. Una célula hospedadora aislada que comprende un vector de la reivindicación 3.

5. Un método para producir un polipéptido de la reivindicación 1 que comprende:

a) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido; y

b) recuperar el polipéptido del cultivo de células hospedadoras.

6. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de la reivindicación 1 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. Una composición de terapia génica que comprende un polinucleótido de la reivindicación 2 en combinación con un vector de terapia génica terapéuticamente eficaz.

8. El polipéptido de la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido se representa mediante la ID SEC N°: 72.

9. Un anticuerpo purificado que se une de manera específica al polipéptido de la reivindicación 1.

10. El uso de un agonista de PACAP R3 seleccionado del grupo que consiste en ID SEC N°s: 47, 72-82 y 85 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno metabólico en un mamífero.

11. El uso según la reivindicación 10, en el que el agonista de PACAP R3 tiene una selectividad de al menos alrededor de 100 veces por PACAP R3 respecto de PACAP R2 o PACAP R1.

12. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 11, en el que el agonista de R3 es el polipéptido de la ID SEC N°: 72.

13. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en el que dicho trastorno metabólico es diabetes tipo 2.

14. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en el que dicha cantidad terapéuticamente eficaz oscila de alrededor de 0,1  $\mu\text{g/kg}$  a alrededor de 1 mg/kg.

15. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en el que dicho trastorno metabólico es el estado prediabético de intolerancia a la glucosa.

16. El uso de un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en los polipéptidos de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para estimular la liberación de insulina de una manera dependiente de glucosa en un mamífero.

17. El uso de un péptido seleccionado del grupo que consiste en ID SEC N°s: 47, 72-82 y 85 para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad respiratoria en un mamífero.

# ES 2 307 534 T3

			ID.	SEC.
			N°	
R3P8	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK-NH <sub>2</sub>	28	11
R3P9*	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKGGT	31	12
R3P10	1	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNLLNGGT	31	13
R3P11	1	HSDAVFTDNYTKLRKQLAAKKYLNILNGGT	31	14
R3P19	1	HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNLLKGGTSWCEPGWCR	39	18
R3P22	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLSIKKGGT	31	21
R3P24	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLIKNGGT	31	22
R3P25	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLSIKKGGT	31	23
R3P26	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKGGT	31	24
R3P29	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNLIKNGGT	31	25
R3P30	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLSIKKGGT	31	26
R3P36	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLIKKKRY	31	32
rR3P41	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK	28	33
rR3P42	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK	28	34
rR3P43	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSILK	28	35
rR3P44	1	HSDAVFTDNYTELRKQMAVKKYLSILN	28	36
rR3P48	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNILN	28	40
rR3P49	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKK	28	41
rR3P50	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSILK	28	42
rR3P51*	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKK	28	43
rR3P52	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKKRY	31	44
rR3P53*	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKKR	30	45
rR3P54	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKK	29	46
rR3P55*	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKRY	31	47
rR3P56	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKKRY	31	48
rR3P57	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKKR	30	49
rR3P58	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKK	29	50
rR3P59	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKNKRY	31	51
rR3P60	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKK	28	52
rR3P61	1	HSDAVFTDNYTRLRKQIAAKKYLSITIKK	28	53
R3P6	1	HSDGIFTESYSRYRKQMAVKKYLAALKKKRYKQRVKNK	38	57
R3P7	1	HSDAVFTENYTRLRKQMAVKKYLSLKK-NH <sub>2</sub>	28	58
R3P16	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLSAVRHGQT-NH <sub>2</sub>	31	59
R3P16	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKQGGT-NH <sub>2</sub>	31	60
R3P17	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKKYLAAVRHG-NH <sub>2</sub>	36	61
R3P23	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLIKGGT	31	63
R3P27	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLIKNGGT	31	64
R3P28	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNLIKGGT	31	65
R3P37	1	HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKKGGT	31	66
R3P38	1	HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKK	28	67
R3P39	1	HSDGIFTDSYSRYRKQLAVKKYLAAVKK	28	68
R3P40	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKK	28	69
R3P62	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKK	28	70
R3P65	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKR	30	71
R3P66	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKNKRY	31	72
R3P67	1	HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLIKNKRY	31	73
R3P68	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKNKRY	31	74
R3P69	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKRY	31	75
R3P70	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLIKNKRY	31	76
R3P71	1	HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKNKRY	31	77
R3P72	1	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLNLIKNKRY	31	78
R3P73	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHKYLSIKNKRY	31	79
R3P74	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLSIKNKRY	31	80
R3P75	1	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAHKYLNLIKNKRY	31	81

# ES 2 307 534 T3

R3P76	1	HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKHYLNTIKNKRY	31	82
R3P77	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKKKR	30	83
R3P78	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKKKR	30	84
R3P79	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLNSIKNKRY	31	85
R3P80	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKKR	30	86
R3P81	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKK	29	87
R3P82	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKNKRY	31	88
R3P83	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKKRY	31	89
R3P84	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKKR	30	90
R3P85	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKK	29	91
R3P86	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNK	29	92
R3P87	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKRY	31	93
R3P88	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKKR	30	94
R3P89	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKK	29	95
R3P91	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLQSIKNK	29	96
R3P92	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNKRY	31	97
R3P93	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKNR	30	98
R3P94	1	HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLQSIKN	29	99
rR3P99	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAEKKYLSIKNKR	30	102
rR3P100	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLSIKNKR	30	103
rR3P101	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR	30	104
rR3P102	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAHKKYLSIKNKR	30	105
rR3P103	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAIKKYLSIKNKR	30	106
rR3P104	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR	30	107
rR3P105	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMALKKYLNSIKNKR	30	108
rR3P106	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAMKKYLNSIKNKR	30	109
rR3P107	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMANKKYLSIKNKR	30	110
rR3P108	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAPKKYLNSIKNKR	30	111
rR3P109	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAQKKYLNSIKNKR	30	112
rR3P110	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLSIKNKR	30	113
rR3P111	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKYLSIKNKR	30	114
rR3P112	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAATKKYLNSIKNKR	30	115
rR3P113	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSIKNKR	30	116
rR3P114	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAWKKYLSIKNKR	30	117
rR3P115	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKYLNSIKNKR	30	118
rR3P116	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIANKR	30	119
rR3P118	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIDNKR	30	121
rR3P119	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIENKR	30	122
rR3P120	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIFNKR	30	123
rR3P121	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIGNKR	30	124
rR3P122	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIHNR	30	125
rR3P123	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIINKR	30	126
rR3P124	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIMNKR	30	127
rR3P125	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSINNKR	30	128
rR3P126	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIPNKR	30	129
rR3P127	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIQNKR	30	130
rR3P128	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIRNKR	30	131
rR3P129	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSISNKR	30	132
rR3P130	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSITNKR	30	133
rR3P131	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIVNKR	30	134
rR3P132	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIWNKR	30	135
rR3P133	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIYNKR	30	136
rR3P134	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNAR	30	137
rR3P136	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNDR	30	139
rR3P137	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNER	30	140
rR3P138	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNFR	30	141
rR3P139	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNGR	30	142
rR3P140	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNHR	30	143
rR3P141	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNIR	30	144

# ES 2 307 534 T3

rR3P142	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNLR	30	145
rR3P143	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNMR	30	146
rR3P144	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNNR	30	147
rR3P145	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNPR	30	148
rR3P146	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNQR	30	149
rR3P147	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRR	30	150
rR3P148	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNSR	30	151
rR3P149	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNTR	30	152
rR3P150	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNVR	30	153
rR3P151	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNWR	30	154
rR3P152	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNYR	30	155
rR3P153	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKA	30	156
rR3P155	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKD	30	157
rR3P156	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKE	30	158
rR3P157	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKF	30	159
rR3P158	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKG	30	160
rR3P159	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKH	30	161
rR3P160	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKI	30	162
rR3P161	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKK	30	163
rR3P162	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKL	30	164
rR3P163	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKM	30	165
rR3P164	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKN	30	166
rR3P165	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKP	30	167
rR3P166	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKQ	30	168
rR3P167	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKS	30	169
rR3P168	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKT	30	170
rR3P169	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKV	30	171
rR3P170	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKW	30	172
rR3P171	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKY	30	173
R3P172	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKRYSWCEPGWCR	39	174
R3P173	1	HSDAVFTDDYTRLRKEVAACKYLESIKDKRY	31	175
rR3P174	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRI	30	322
rR3P175	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIKNRI	30	323
rR3P176	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIKNRI	30	324
rR3P177	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIKNRI	30	325
rR3P178	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIKNRI	30	326
rR3P179	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIPNRI	30	327
rR3P180	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIPNRI	30	328
rR3P181	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIPNRI	30	329
rR3P182	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIPNRI	30	330
rR3P183	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIPNRI	30	331
rR3P184	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIQNRI	30	332
rR3P185	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIQNRI	30	333
rR3P186	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIQNRI	30	334
rR3P187	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIQNRI	30	335
rR3P188	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIQNRI	30	336
rR3P189	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIRNRI	30	337
rR3P190	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIRNRI	30	338
rR3P191	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLNLSIRNRI	30	339
rR3P192	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIRNRI	30	340
rR3P193	1	HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKYLNLSIRNRI	30	341
PAC1	1	ESDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	176
PAC2	1	HKDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	177
PAC4	1	HSDKIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	179
PAC5	1	HSDGKFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	180
PAC8	1	HSDGIFTKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	183
PAC9	1	HSDGIFTDKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	184
PAC10	1	HSDGIFTDSKSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	185
PAC11	1	HSDGIFTDSYKRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	186



PAC12	1	HSDGIFTDSYSEYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	187
PAC13	1	HSDGIFTDSYSRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	188
PAC14	1	HSDGIFTDSYSRYEKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	189
PAC15	1	HSDGIFTDSYSRYREQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	190
PAC16	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	191
PAC17	1	HSDGIFTDSYSRYRKQKAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	192
PAC18	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMKVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	193
PAC19	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAKKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	194
PAC20	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVEKYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	195
PAC21	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKEYLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	196
PAC22	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKKLA AVL-NH <sub>2</sub>	27	197
PAC23	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYKA AVL-NH <sub>2</sub>	27	198
PAC24	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLK AVL-NH <sub>2</sub>	27	199
PAC25	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAK VL-NH <sub>2</sub>	27	200
PAC26	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AKL-NH <sub>2</sub>	27	201
PAC27	1	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVK-NH <sub>2</sub>	27	202

Figura 1

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Fig 2

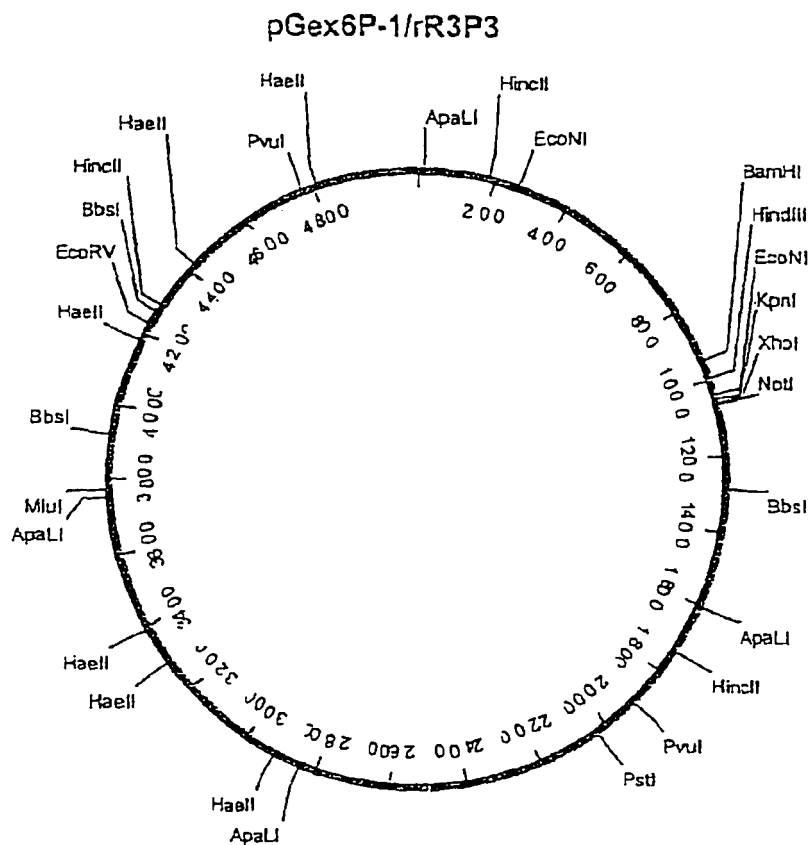


Figura 3

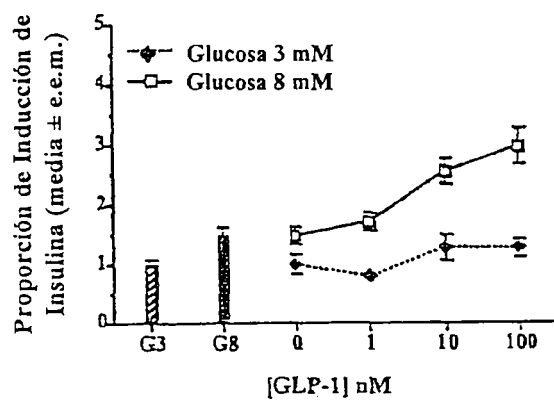


Figura 4A

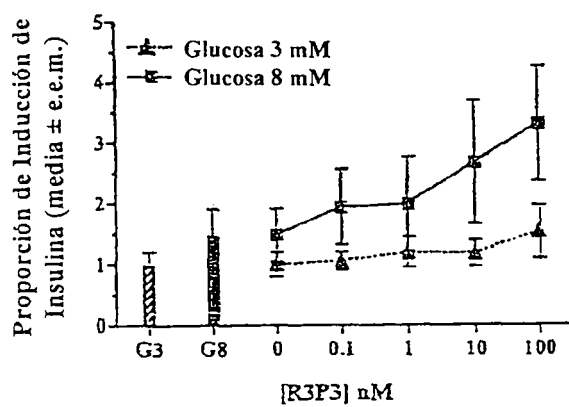


Figura 4B

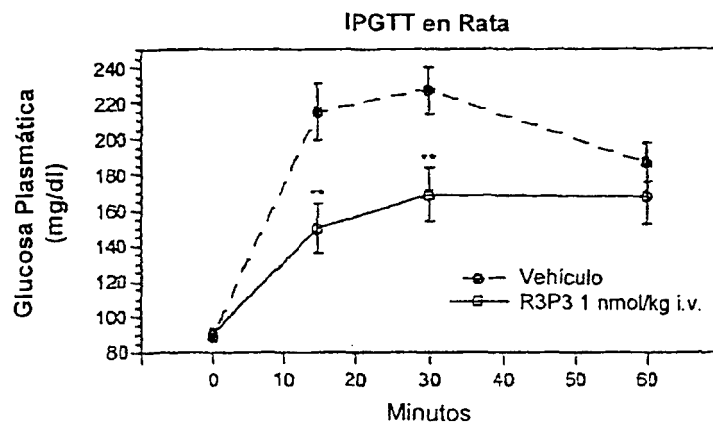


Fig. 5

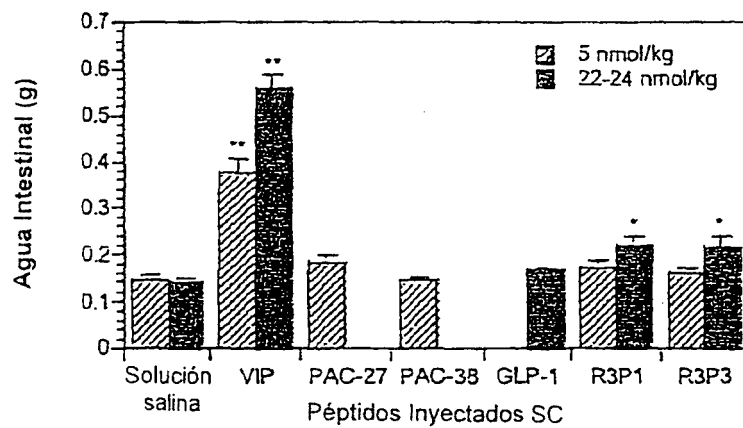


Fig. 6

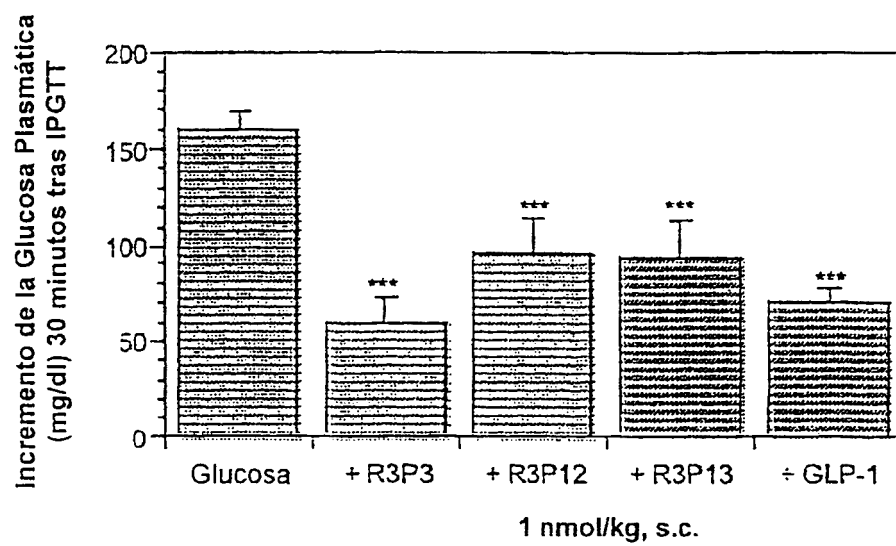


Fig. 7

## ES 2 307 534 T3

rPACAP 27 (ID SEC N°: 203)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGGTATCTTCACCGACTCCTACTCGAGGTACCGCAAGCAGAT  
GGCTGTAAGAAATATCTGGCTGCAGTTCGTAACTGACTCGAG

rPACAP 38 (ID SEC N°: 54)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGGTATCTTCACCGACTCCTACTCTCGGTACCGCAAGCAGATG  
GCTGTAAGAAATATCTGGCTGCAGTCTAGGCAAACGTTACAAGCAACGCGTTAAAAACAAGTAATGA  
CTCGAG

rVIP (ID SEC N°: 55)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAACTAATGACTCGAG

rR3P3 (ID SEC N°: 56)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGCTGTTTTACCGAAAACCTACACCAAGCTTCGTAAACAGCTG  
GCAGCTAAGAAATACCTCAACGACCTGAAAAAGGGCGGTACCTAATGACTCGAG

rR3P9 (ID SEC N°: 204)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAGGCGGTACCTAATGACTCGAG

rR3P12 (ID SEC N°: 205)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGCTG  
GCTGCTAAGAAATACCTGAACGACATCAAGAAAGGTGGCACCTAATGACTCGAG

rR3P33 (ID SEC N°: 206)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGCTG  
GCTGCTAAGAAATACCTGAACGACATCAAGAAATAATGAC

rR3P41 (ID SEC N°: 207)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAATAATGACTCGAG

rR3P42 (ID SEC N°: 208)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAACTAATGACTCGAG

rR3P43 (ID SEC N°: 209)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAAATAATGACTCGAG

rR3P44 (ID SEC N°: 210)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGGAACCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAACTAATGACTCGAG

rR3P45 (ID SEC N°: 211)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTGAACAGAT  
GGCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAACTAATGACTCGAG

rR3P46 (ID SEC N°: 212)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGCTG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAACTAATGACTCGAG

## ES 2 307 534 T3

rR3P47 (ID SEC N°: 213)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAACTAATGACTCGAG

rR3P48 (ID SEC N°: 214)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATGACATCCTGAACTAATGACTCGAG

rR3P49 (ID SEC N°: 215)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAACTAATGACTCGAG

rR3P50 (ID SEC N°: 216)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCCTGAAATAATGACTCGAG

rR3P51 (ID SEC N°: 217)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAATAATGACTCGAG

rR3P52 (ID SEC N°: 218)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGCGTTACTAATGACTCGAG

rR3P53 (ID SEC N°: 219)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGCGTTAATGACTCGAG

rR3P54 (ID SEC N°: 220)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGTAATGACTCGAG

rR3P55 (ID SEC N°: 221)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAACAGCGTTACTAATGACTCGAG

rR3P56 (ID SEC N°: 222)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGCGTTACTAATGACTCGAG

rR3P57 (ID SEC N°: 223)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGCGTTAATGACTCGAG

rR3P58 (ID SEC N°: 224)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAAAAGTAATGACTCGAG

rR3P59 (ID SEC N°: 225)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGTTAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAACAGCGTTACTAATGACTCGAG

rR3P60 (ID SEC N°: 226)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGGTT  
GCTGCAAAGAAATACCTGCAGTCCATCAAGAAATAATGACTCGAG

rR3P61 (ID SEC N°: 227)

## ES 2 307 534 T3

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATC  
GCTGCAAAGAAATACCTGCAGACTATCAAGAAATAATGACTCGAG

rR3P62 (ID SEC N°: 228)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGGTT  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAAATAATGACTCGAG

rR3P65 (ID SEC N°: 229)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P71 (ID SEC N°: 230)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACCACTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAATTCCATCAAGAACAAGCGTTACTAATGACTCGAG

rR3P98 (ID SEC N°: 231)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTGACAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P99 (ID SEC N°: 232)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTGAGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P100 (ID SEC N°: 233)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTTTCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P101 (ID SEC N°: 234)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTGGCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P102 (ID SEC N°: 235)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTCACAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P103 (ID SEC N°: 236)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTATCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG

rR3P104 (ID SEC N°: 237)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTAAAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTG



## ES 2 307 534 T3

rR3P105 (ID SEC N°: 238)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTCTGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P106 (ID SEC N°: 239)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTATGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P107 (ID SEC N°: 240)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTAACAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P108 (ID SEC N°: 241)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTCCGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P109 (ID SEC N°: 242)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTCAGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P110 (ID SEC N°: 243)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTCGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P111 (ID SEC N°: 244)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTTCCAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P112 (ID SEC N°: 245)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTACCAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P113 (ID SEC N°: 246)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTGTGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P114 (ID SEC N°: 247)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTTGAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P115 (ID SEC N°: 248)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAGAAAACAGATG  
GCTTACAAGAAATACCTGAACCTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P116 (ID SEC N°: 249)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P118 (ID SEC N°: 250)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGACAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P119 (ID SEC N°: 251)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P120 (ID SEC N°: 252)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTTCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P121 (ID SEC N°: 253)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGCAACAAGCGTTAAAGAGAATTC

rR3P122 (ID SEC N°: 254)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P123 (ID SEC N°: 255)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCATCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P124 (ID SEC N°: 256)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCATGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P125 (ID SEC N°: 257)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAACAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P126 (ID SEC N°: 258)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCCGGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P127 (ID SEC N°: 259)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCCAGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P128 (ID SEC N°: 260)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P129 (ID SEC N°: 261)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P130 (ID SEC N°: 262)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGCAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P131 (ID SEC N°: 263)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGTGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P132 (ID SEC N°: 264)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTGGAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P133 (ID SEC N°: 265)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTACAACAAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P134 (ID SEC N°: 266)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGCGCGTTAATGAGAATTC

rR3P135 (ID SEC N°: 267)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGACCGTTAATGAGAATTC

rR3P137 (ID SEC N°: 268)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGAACGTTAATGAGAATTC

rR3P138 (ID SEC N°: 269)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACTCCGTTAATGAGAATTC

rR3P139 (ID SEC N°: 270)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGGCCGTTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P140 (ID SEC N°: 271)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCACCGTTAATGAGAATTC

rR3P141 (ID SEC N°: 272)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACATCCGTTAATGAGAATTC

rR3P142 (ID SEC N°: 273)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAATTC

rR3P143 (ID SEC N°: 274)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACATGCGTTAATGAGAATTC

rR3P144 (ID SEC N°: 275)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAACCGTTAATGAGAATTC

rR3P145 (ID SEC N°: 276)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAATTC

rR3P146 (ID SEC N°: 277)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P147 (ID SEC N°: 278)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAATTC

rR3P148 (ID SEC N°: 279)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCAGCGTTAATGAGAATTC

rR3P149 (ID SEC N°: 280)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCACCGTTAATGAGAATTC

rR3P150 (ID SEC N°: 281)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P151 (ID SEC N°: 282)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAAGCTGGCGTTAATGAGAATTC

rR3P152 (ID SEC N°: 283)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAAGCTACCGTTAATGAGAATTC

rR3P153 (ID SEC N°: 284)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGCGTAATGAGAATTC

rR3P155 (ID SEC N°: 285)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGACTAATGAGAATTC

rR3P156 (ID SEC N°: 286)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGAGTAATGAGAATTC

rR3P157 (ID SEC N°: 287)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTTCTAATGAGAATTC

rR3P158 (ID SEC N°: 288)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGGCTAATGAGAATTC

rR3P159 (ID SEC N°: 289)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCACTAATGAGAATTC

rR3P160 (ID SEC N°: 290)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGATCTAATGAGAATTC

rR3P161 (ID SEC N°: 291)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTAATGAGAATTC

rR3P162 (ID SEC N°: 292)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCTGTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P163 (ID SEC N°: 293)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGATGTAATGAGAATTC

rR3P164 (ID SEC N°: 294)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGAACTAATGAGAATTC

rR3P165 (ID SEC N°: 295)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCCGTAATGAGAATTC

rR3P166 (ID SEC N°: 296)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCAGTAATGAGAATTC

rR3P167 (ID SEC N°: 297)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGAGCTAATGAGAATTC

rR3P168 (ID SEC N°: 298)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGACCTAATGAGAATTC

rR3P169 (ID SEC N°: 299)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGTGTAATGAGAATTC

rR3P170 (ID SEC N°: 300)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTGTAATGAGAATTC

rR3P171 (ID SEC N°: 301)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTACTAATGAGAATTC

rR3P174 (ID SEC N°: 302)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAATTC

rR3P175 (ID SEC N°: 303)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAATTC

# ES 2 307 534 T3

rR3P176 (ID SEC N°: 304)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTaaaAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P177 (ID SEC N°: 305)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTcgcAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P178 (ID SEC N°: 306)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTtccAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P179 (ID SEC N°: 307)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P180 (ID SEC N°: 308)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTggcAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P181 (ID SEC N°: 309)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTaaaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P182 (ID SEC N°: 310)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTcgcAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P183 (ID SEC N°: 311)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTtccAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P184 (ID SEC N°: 312)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P185 (ID SEC N°: 313)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTggcAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P186 (ID SEC N°: 314)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTaaaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P187 (ID SEC N°: 315)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTcgcAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P188 (ID SEC N°: 316)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTtccAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P189 (ID SEC N°: 317)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P190 (ID SEC N°: 318)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTggcAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATTC

## ES 2 307 534 T3

rR3P191 (ID SEC N°: 319)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTaaaAAGAAATACCTGAACTCCATCcgtaACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P192 (ID SEC N°: 320)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTcgcAAGAAATACCTGAACTCCATCcgtaACCGTATCTAATGAGAATTC

rR3P193 (ID SEC N°: 321)

GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGCGTAAACAGATG  
GCTtccAAGAAATACCTGAACTCCATCcgtaACCGTATCTAATGAGAATTC

Figura 8



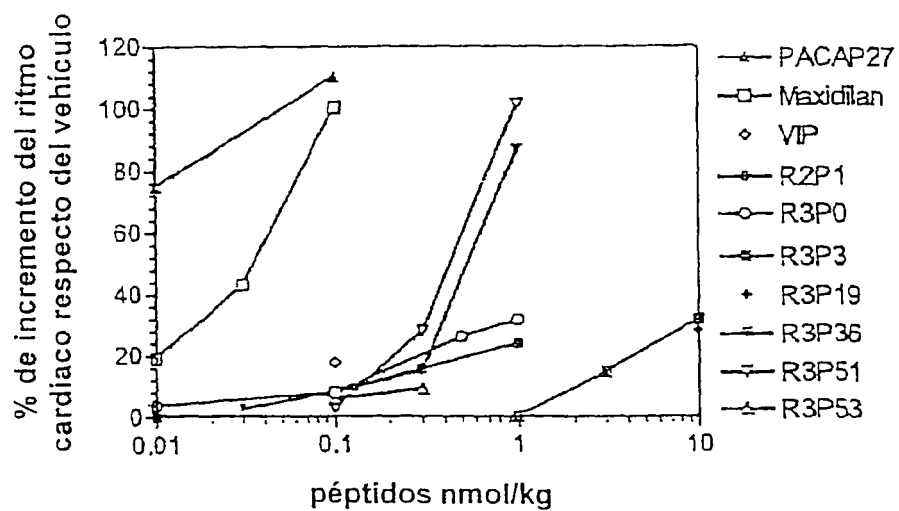


Figura 9

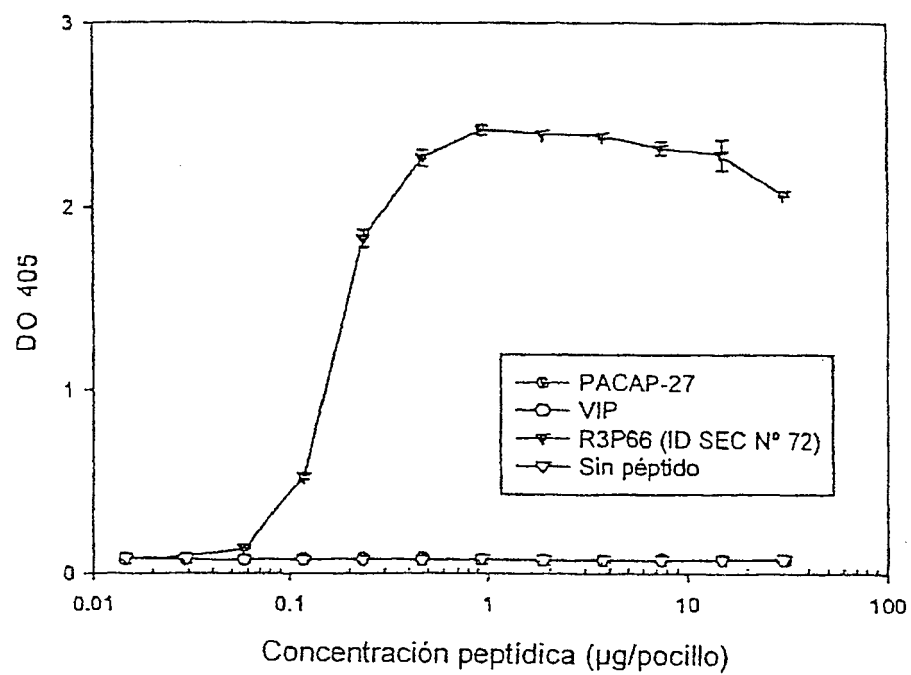


Fig. 10