



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 453**

51 Int. Cl.:
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 38/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97910064 .1**
86 Fecha de presentación : **10.10.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0951472**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.1999**

54 Título: **Composiciones de péptidos con actividad similar a la de los factores de crecimiento.**

30 Prioridad: **31.10.1996 US 742256**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.04.2007

73 Titular/es:
The Regents of the University of California
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, California 94607-5200, US

72 Inventor/es: **Bhatnagar, Rajendra, S. y**
Qian, Jing, Jing

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

Composiciones de péptidos con actividad similar a la de los factores de crecimiento.

5 **Campo del invento**

El invento se refiere, en general, a factores de crecimiento y factores neurotróficos, y, más particularmente, a pequeños péptidos sintéticos que tienen (o mimetizan) actividad TGF- β , y a matrices y composiciones que incluyen estos pequeños compuestos peptídicos miméticos.

Ésta es una solicitud, de continuación en parte, del documento U. S. N° de Serie 08/431.954, presentado el 1 de Mayo de 1.995, ahora Patente de EE.UU. n° 5.661.127, concedida el 26 de Agosto de 1.997.

15 **Antecedentes del invento**

Los factores de crecimiento son sustancias, tales como las hormonas polipeptídicas, que afectan al crecimiento de poblaciones definidas de células animales *in vivo* o *in vitro*, pero que no son sustancias nutrientes. Las proteínas implicadas en el crecimiento y la diferenciación de tejidos pueden promover o inhibir el crecimiento y promover o inhibir la diferenciación y, por lo tanto, la expresión general "factor de crecimiento" incluye citocinas y factores tróficos.

Típicamente, los factores de crecimiento son polipéptidos con pesos moleculares que varían de 5.000 a 50.000 dáltones. Basándose en similitudes estructurales, los factores de crecimiento se clasifican en familias que incluyen: factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs; del inglés, insulin-like growth factors), factores de crecimiento derivados de plaquetas (PDGFs; del inglés, platelet-derived growth factors), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs; del inglés, fibroblast growth factors), factores de crecimiento epidérmico (EGFs; del inglés, epidermal growth factors), factores de crecimiento nervioso (NGFs; del inglés, nerve growth factors) y factores de crecimiento transformantes de tipo beta (TGF- β s; del inglés, transforming growth factors type- β).

Los factores β de crecimiento transformantes fueron originalmente nombrados por su capacidad para transformar fibroblastos normales en células capaces de un crecimiento independiente del anclaje. Sin embargo, a pesar de su nombre, los TGF- β s son factores de crecimiento multifuncionales que son necesarios para el desarrollo, el crecimiento y la diferenciación normales de diversas células epiteliales, endoteliales y mesenquimales. Como en el caso de otras citocinas, el efecto específico de los TGF- β s depende del tipo celular concreto y de su ambiente circundante.

Los efectos de los TGF- β s sobre las células son generalmente clasificados como proliferativos y no proliferativos. Como se estableció originalmente con los primeros experimentos sobre fibroblastos, los TGF- β s son factores de crecimiento *bona fide*. Dos tipos celulares importantes en que el TGF- β potencia la proliferación son los osteoblastos y las células de Schwann del sistema nervioso periférico. Sin embargo, en muchas células, los TGF- β s son potentes inhibidores de la proliferación celular. Este control negativo del crecimiento puede ser el mecanismo regulador que refrene la regeneración de ciertos tejidos y puede desempeñar un papel en el inicio de la carcinogénesis.

La función no proliferativa más importante de los TGF- β s está en la potenciación de la formación de matrices extracelulares. Aunque esto se lleva esencialmente a cabo a través de la transcripción aumentada tanto del colágeno como de la fibronectina, la inhibición de las proteasas en cuanto a la degradación de la matriz también contribuye a su estabilidad. La degradación de la matriz extracelular es inhibida por la disminución de la secreción de las propias proteasas y por el aumento simultáneo de los niveles de inhibidores de proteasas. Es probable que el efecto acusado y generalizado del TGF- β sobre las matrices extracelulares desempeñe un papel fundamental en los procesos de reparación tisular y en la patogénesis de ciertas enfermedades fibróticas.

Recientemente, Lin *et al.*, Solicitud PCT WO93/09228, publicada el 13 de Mayo de 1.993, han descrito DNA que codifica varios receptores diferentes para TGF- β . La disponibilidad de los receptores de TGF- β facilitará ulteriores valoraciones de las funciones de TGF- β .

Se han caracterizado muchos miembros de la superfamilia de TGF- β . Por ejemplo, Basler *et al.* han representado gráficamente la relación de secuencias entre miembros de la superfamilia de TGF- β [Cell, 73, páginas 687-702 (1.993)]. Massagué, *Annu. Rev. Cell Biol.*, 6, páginas 597-641 (1.990), también revisa la familia del factor β de crecimiento transformante, incluyendo una discusión de los mecanismos de las acciones de TGF- β . Se ha comunicado una caracterización de la estructura secundaria de TGF- β 1 por resonancia magnética nuclear, y Daopin *et al.*, *Proteins*, 17, páginas 176-192 (1.993), han descrito una estructura cristalina tridimensional refinada de TGF- β 2. El monómero de TGF- β 2 adopta una plegadura que parece una mano izquierda ligeramente arrollada, con dos láminas β antiparalelas que forman cuatro dedos de la mano. Estas regiones de cuatro dedos junto con disulfuros conservados definen la plegadura de la superfamilia de TGF- β .

Entre los miembros de TGF- β están también las proteínas morfogenéticas óseas (BMP; del inglés, bone morphogenetic proteins). Las BMPs han sido indicadas como útiles en la cicatrización de heridas y la reparación de tejidos y para inducir el crecimiento de cartílagos y/o huesos. Por ejemplo, Israel y Wolfman, los inventores de la Solicitud

PCT 9309229, publicada el 13 de Mayo de 1.993, describen usos de proteínas con actividad estimulante de huesos, tales como la cicatrización de fracturas óseas y, posiblemente, el tratamiento de la enfermedad periodontal y otros procesos de reparación de dientes. Hubbel y Langer, en un reciente artículo especial de C&EN, páginas 42-54 (13 de Marzo de 1.995), comunican que se ha incorporado una BMP a partículas de polímero para que, conforme se degrade el polímero, la proteína sea liberada lentamente a los tejidos circundantes, donde estimula la migración de células en la matriz porosa y, finalmente, la síntesis de nuevo hueso. En el artículo también se indica que se ha producido hueso por liberación lenta de TGF- β .

A causa de la gran aplicabilidad de TGF- β s en terapias clínicas, han sido el centro de mucha investigación. Aunque gran parte de la investigación atañía a usos *in vitro*, estudios *in vivo* recientes han confirmado algunos de los más prometedores efectos *in vitro*. Como consecuencia, algunos de los posibles usos clínicos para los TGF- β s incluyen la estimulación de la angiogénesis, la formación de tejido de granulación asociada con la cicatrización de heridas, y la formación de hueso y cartílago.

En la Patente de EE.UU. 5.284.763, concedida el 8 de Febrero de 1.994, los inventores Derynk y Goeddel describen ácido nucleico que codifica TGF- β y una diversidad de usos para el TGF- β . En la Patente de EE.UU. 5.258.029, concedida el 2 de Noviembre de 1.993, los inventores Chu *et al.* describen preparaciones de una prótesis que soporta esfuerzos, con crecimiento óseo hacia dentro que se produce después del implante, prótesis que incluye TGF- β portado por una composición de colágeno o un producto cerámico. En la Patente de EE.UU. 5.368.858, concedida el 29 de Noviembre de 1.994, el inventor Hunziker describe preparaciones de matrices biodegradables que incluyen TGF- β s como agentes de proliferación, agentes quimiotácticos y factores transformantes.

En la Patente de EE.UU. 5.055.447, concedida el 8 de Octubre de 1.991, los inventores Palladino *et al.* describen métodos y composiciones para el tratamiento o la profilaxis del shock séptico causado por una infección bacterémica. De este modo, por ejemplo, en esta patente se enseña un método terapéutico para un paciente que padece, o tiene riesgo de, shock séptico mediante la administración de factor β de crecimiento transformante. El concepto de “sepsis” ha sido recientemente considerado más ampliamente como un estado inflamatorio, y un grupo de investigadores ha sugerido la denominación “síndrome de respuesta inflamatoria sistémica” para describir tanto la “sepsis” (infección por la presencia de bacterias en la corriente sanguínea) como otros estados inflamatorios (no sépticos) [*Chest*, 101, páginas 1.644-1.655 (1.992)].

Por lo tanto, los factores de crecimiento son útiles en diversas aplicaciones terapéuticas, clínicas, diagnósticas, de investigación y de diseño de fármacos. Sin embargo, como se mencionó previamente, los factores de crecimiento son típicamente grandes. El peso molecular de los miembros naturales de la familia del factor β de crecimiento transformante se extiende hasta más de 25 kDa. Los usos clínicos de los factores de crecimiento, incluyendo los TGF- β s, pueden estar limitados a causa de su tamaño, tal como en el caso de causar respuestas inmunes. Por ejemplo, el TGF- β 1 humano es una proteína homodímera de 25.000 dáltones. Además de las posibles respuestas inmunológicas negativas, las proteínas grandes no son a menudo los mejores candidatos para fármacos a causa de las dificultades en la administración y la distribución. En el Documento WO9417099 se describen péptidos (ejemplos que tienen una longitud de aproximadamente 32 aminoácidos) que corresponden a regiones de TGF-beta 1 o beta-2; conservan y mimetizan las actividades biológicas de TGF-betas activos y maduros y, por lo tanto, pueden usarse para la formación de cartílago/hueso y para la reparación, reposición o aumento de tejido cartilaginoso/óseo en animales.

En consecuencia, pequeños compuestos peptídicos miméticos de factores de crecimiento naturales que evitaren la mayoría de estos problemas serían deseables para aplicaciones que incluyen aquéllas para las que se ha destinado o sugerido el TGF- β . Sería ventajoso tener péptidos pequeños que mimetizaran la actividad biológica de los grandes miembros naturales ya que los péptidos pequeños requerirían, sobre una base mol por mol, cantidades netas mucho más pequeñas en su administración, y las aplicaciones tópicas serían más factibles. Además, los péptidos realmente pequeños tenderían a producir poca o ninguna respuesta inmunológica negativa y podrían ser fácilmente sintetizados usando sencillos procedimientos de química peptídica.

Sumario del invento

El presente invento describe la caracterización, propiedades y usos de compuestos peptídicos miméticos de TGF- β . Puesto que la característica crítica de la actividad TGF- β es la capacidad del péptido para mantener una estructura de giros β estables bajo condiciones fisiológicas, a los péptidos del presente invento se hace colectivamente referencia como péptidos de giro β .

Los péptidos de giro β tienen la siguiente secuencia inicial de aminoácidos: AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2} en que AA_i es alanina, asparagina o leucina, AA_{i+1} es valina o isoleucina y AA_{i+2} es alanina. Esta secuencia va inmediatamente seguida por, o tiene próximo a ella, un aminoácido con una cadena lateral que contiene carbonilo. Puesto que el resto de aminoácido con una cadena lateral que contiene carbonilo no necesariamente ha de ir seguido inmediatamente por, es decir, ser adyacente a, AA_{i+2}, es referido como AA_{i+n} en que n es un número entero igual o superior a tres. Si n es superior a 3, n-3 (“n menos 3”) restos de aminoácido estarían entonces entre AA_{i+2} y AA_{i+n} en la secuencia peptídica.

Por ejemplo, el nuevo péptido de giro β puede incluir la secuencia AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3} en que de AA_i a AA_{i+2} son como antes y AA_{i+3} es el resto de aminoácido con una cadena lateral que contiene carbonilo (y es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina). Otro ejemplo es la secuencia AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4} en que el resto

con la cadena lateral que contiene carbonilo no es inmediatamente adyacente a, aunque en vez de ello está próximo a, la secuencia inicial. En este caso, de AA_i a AA_{i+2} son como antes, AA_{i+3} es cualquier aminoácido adecuado y AA_{i+4} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina. Aún otro ejemplo es la secuencia $AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4}-AA_{i+5}$. Aquí, de AA_i a AA_{i+2} son como antes, AA_{i+3} y AA_{i+4} son aminoácidos adecuados y AA_{i+5} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina.

El péptido original del que se ha descubierto que tiene actividad TGF- β ha sido denominado "citomodulina". En una realización especialmente preferida del presente invento, la citomodulina, cuando se añade a células en cultivo en una concentración en el intervalo de 10^{-9} a 10^{-6} M (1,4 pg/ml a 1.400 pg/ml), promueve ciertos efectos de TGF- β muy específicos en varios tipos celulares diferentes. Por ejemplo, entre los efectos observados está la inhibición de la síntesis de DNA en células epiteliales Mv-1-Lu de pulmón de visón, el crecimiento y la formación de colonias por fibroblastos NRK-49 F en agar blando, y la inducción de una expresión aumentada de colágeno de tipo I en cultivos primarios de fibroblastos dérmicos humanos neonatales. Además, resultados iniciales con una línea celular de sarcoma osteogénico humano (HOS; del inglés, human osteogenic sarcoma) indican que la citomodulina puede ser también un compuesto mimético para otros miembros de la superfamilia de TGF- β , tales como las proteínas morfogénicas óseas (BMPs) y las proteínas osteogénicas (OPs; del inglés, osteogenic proteins), como es evidenciado por su capacidad para estimular específicamente a marcadores (fosfatasa alcalina y osteonectina) característicos del fenotipo osteoblástico.

Los nuevos péptidos de giro β son fácilmente sintetizados mediante técnicas conocidas en este campo técnico. De este modo, en un aspecto del presente invento, se proporcionan péptidos biológicamente activos para promover respuestas características de las promovidas por TGF- β .

En otro aspecto del presente invento, una composición para reparación tisular comprende una matriz biocompatible combinada con al menos un nuevo péptido de giro β . La matriz biocompatible puede ser biodegradable o no biodegradable. El péptido o los péptidos son mezclados con, o portados por, la matriz en una cantidad eficaz para promover el crecimiento celular. Dichas matrices son útiles en la construcción de moldes para la reparación de tejidos duros y blandos, para una rápida reposición de tejido perdido y para cirugía reconstructiva y plástica. Dichos materiales compuestos proporcionan y mantienen la regeneración celular y pueden ser usados en combinación con otros factores de crecimiento, aunque, sorprendentemente, la citomodulina, una realización peptídica especialmente preferida del invento, induce la formación de colonias de fibroblastos sin la presencia de factores de crecimiento adicionales tales como el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas.

En aún otro aspecto del presente invento, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende al menos uno de los nuevos péptidos de giro β y un vehículo fisiológicamente compatible.

Los nuevos péptidos de giro β del presente invento tienen una actividad biológica que mimetiza al menos una actividad biológica de TGF- β s, tal como la inhibición de la síntesis de DNA en células epiteliales Mv-1-Lu de pulmón de visón, la activación del crecimiento y la formación de colonias por fibroblastos NRK-49 F, la inducción de una expresión aumentada de colágeno de tipo I y/o la inducción de la expresión de TGF- β .

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 ilustra gráficamente la inhibición de la síntesis de DNA de células epiteliales Mv-1-Lu de pulmón de visón por citomodulina;

La Figura 2 son fotomicrografías (ampliadas 500 veces): la (A) es un testigo, la (B) es con citomodulina 100 nM y la (C) es citomodulina 100 nM más EGF y PDGF, todas relativas a cinco días en agar blando con fibroblastos NRK-49 F de riñón de rata normal;

La Figura 3 ilustra gráficamente la modulación de la expresión génica en células HOS por citomodulina: los gráficos (A), (B) y (D) muestran una expresión aumentada mientras que el (C) muestra una actividad modulada que depende de la concentración, lo que, sin embargo, es bastante característico de TGF- β en células;

La Figura 4, que tiene los gráficos (A) a (D), son transferencias Northern que corresponden a los datos gráficamente ilustrados por la Figura 3 y sus respectivos gráficos (A)-(D);

La Figura 5 proporciona las coordenadas atómicas para los números atómicos 1-101 de la realización de citomodulina del invento;

La Figura 6 muestra curvas de inhibición del crecimiento de células MV-1-Lu por compuestos análogos de citomodulina: Leu-Ile-Ala-Pro-Glu-Ala (ID. SEC. n° 3 o "L1") y Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Lys (ID. SEC. n° 2 o "L2"); y

La Figura 7 muestra la inducción de colágeno $\alpha 1$ (I) por los compuestos análogos de citomodulina L1 y L2 y por TGF- β en fibroblastos dérmicos humanos neonatales.

Descripción de las realizaciones preferidas

Se han preparado pequeños compuestos peptídicos miméticos de TGF- β . Puesto que la característica crítica de la actividad TGF- β es la capacidad del péptido para mantener una estructura de giros β estables bajo condiciones fisiológicas, a los péptidos del presente invento se hace colectivamente referencia como péptidos de giro β .

Los péptidos del invento tienen la siguiente secuencia inicial de aminoácidos: AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2} en que AA_i es alanina, asparagina o leucina, AA_{i+1} es valina o isoleucina y AA_{i+2} es alanina. Esta secuencia va inmediatamente seguida por, o tiene próximo a ella, un aminoácido con una cadena lateral que contiene carbonilo. Puesto que el resto de aminoácido con una cadena lateral que contiene carbonilo no necesariamente ha de ir seguido inmediatamente por, es decir, ser adyacente a, AA_{i+2}, es referido como AA_{i+n} en que n es un número entero igual o superior a tres. Si n es superior a 3, n-3 ("n menos 3") restos de aminoácido estarían entonces entre AA_{i+2} y AA_{i+n} en la secuencia peptídica.

En una realización del invento, n es igual a tres y el resto de aminoácido con la cadena lateral que contiene carbonilo es, por lo tanto, AA_{i+3}. Esto da lugar a péptidos que tienen la siguiente secuencia: AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3} en que AA_i, AA_{i+1} y AA_{i+2} son como antes y AA_{i+3} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina. El péptido original con actividad TGF- β y una realización especialmente preferida del presente invento, la citomodulina, Ala-Asn-Val-Ala-Glu-Asn-Ala (ID. SEC. n° 1), es de esta clase. Aquí, AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3} corresponde a los restos segundo a quinto desde el extremo N de la citomodulina, -Asn-Val-Ala-Glu-. Otra realización preferida son los péptidos Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Lys (ID. SEC. n° 2) y Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Ala (ID. SEC. n° 11). En estos ejemplos, AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3} corresponde a los cuatro primeros restos del péptido, Leu-Ile-Ala-Glu-.

En otra realización, n es igual a cuatro y el resto de aminoácido con la cadena lateral que contiene carbonilo es, por lo tanto, AA_{i+4}. La secuencia de los péptidos de esta clase es AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4}. En esta serie, AA_i, AA_{i+1} y AA_{i+2} son como antes. AA_{i+3} es prolina o glicocola, y AA_{i+4} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina. Una realización preferida de esta clase es Leu-Ile-Ala-Gly-Glu-Gly (ID. SEC. n° 14). Una realización especialmente preferida es el péptido Leu-Ile-Ala-Pro-Glu-Ala (ID. SEC. n° 3). En ambos ejemplos, los cinco primeros aminoácidos N-terminales corresponden a AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4}.

En aún otra realización del presente invento, n es igual a cinco y el resto de aminoácido con la cadena lateral que contiene carbonilo es, por lo tanto, AA_{i+5}. La secuencia de los péptidos de esta clase es AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4}-AA_{i+5}. En esta serie, AA_i, AA_{i+1} y AA_{i+2} son como antes. AA_{i+3} y AA_{i+4} son glicocola, y AA_{i+5} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina. Un miembro especialmente preferido de esta serie es el péptido Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Glu (ID. SEC. n° 13). En este ejemplo concreto, hay una correspondencia uno a uno entre la ID. SEC. n° 3 y la secuencia AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}-AA_{i+3}-AA_{i+4}-AA_{i+5}.

Los péptidos del presente invento pueden ser sintetizados mediante diversos métodos adecuados que son bien conocidos en la técnica, preferiblemente mediante síntesis en fase sólida, manual o automatizada, como desarrolló por vez primera Merrifield y describieron Stewart *et al.* en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1.984). Mediante la síntesis química se juntan los aminoácidos en la secuencia predeterminada comenzando por el extremo C. Los métodos básicos en fase sólida requieren la copulación del aminoácido α -amino protegido C-terminal con un adecuado soporte insoluble de resina. Los aminoácidos para la síntesis requieren la protección del grupo α -amino para asegurar la apropiada formación del enlace peptídico con el resto precedente (o el soporte de resina). Tras la compleción de la reacción de condensación en el extremo carboxílico, el grupo protector del α -amino es eliminado para permitir la adición del resto siguiente. Se han descrito varias clases de grupos α -protectores, véase Stewart *et al.* en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1.984), siendo el terc-butiloxicarbonilo (Boc) basado en uretano, lábil frente a ácidos, el grupo históricamente preferido. Pueden utilizarse otros grupos protectores, y las estrategias químicas relacionadas, incluyendo el 9-fluorenilmetiloxicarbonilo (Fmoc), lábil frente a bases. Además, es necesario tener bloqueados los grupos funcionales reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos hasta que se complete la síntesis. El conjunto complejo de grupos bloqueadores funcionales, junto con las estrategias y las limitaciones a su uso, han sido revisados por Bodansky en *Peptide Synthesis* (1.976) y por Stewart *et al.* en *Solid Phase Peptide Synthesis* (1.984).

La síntesis en fase sólida se inicia mediante la copulación del descrito resto de aminoácido α -amino protegido C-terminal. La copulación requiere agentes activantes, tales como dicitlohexilcarbodiimida (DCC) con o sin 1-hidroxibenzotriazol (HOBT), diisopropilcarbodiimida (DIPC) y etildimetilaminopropilcarbodiimida (EDC). Después de la copulación del resto C-terminal, el grupo protector del α -amino es eliminado mediante ácido trifluoroacético (al 25% o más) en diclorometano en el caso de grupos terc-butiloxicarbonilo (Boc), lábiles frente a ácidos. Una operación de neutralización con trietilamina (al 10%) en diclorometano permite recuperar la amina libre (frente a la sal). Una vez que se ha añadido el resto C-terminal a la resina, se repite el ciclo de desprotección, neutralización y copulación, con operaciones de lavado intermedias, con objeto de prolongar la cadena peptídica protegida. Cada aminoácido protegido se introduce en exceso (de tres a cinco veces) con cantidades equimolares del reactivo de copulación en un disolvente adecuado. Finalmente, una vez que el péptido completamente bloqueado está ensamblado en el soporte de resina, se aplican reactivos para escindir el péptido de la resina y eliminar los grupos bloqueadores de las cadenas laterales. El fluoruro de hidrógeno (HF) anhidro escinde los grupos químicos terc-butiloxicarbonilo (Boc) lábiles frente a ácidos. Se incluyen diversos agentes supresores de compuestos nucleófilos, tales como sulfuro de dimetilo y anisol, para evitar reacciones secundarias, especialmente con grupos funcionales de cadenas laterales.

Se cree que ligeras modificaciones de los aminoácidos de las secuencias peptídicas de giro β no afectarán a la capacidad de los péptidos para formar estructuras de giros β estables. Estas modificaciones incluyen técnicas para conferir resistencia a la degradación enzimática, tal como la adición de grupos bloqueadores tanto a los restos N-terminales como a los C-terminales. Otro método para prevenir la degradación y el prematuro aclaramiento por el sistema renal es el uso de sustitutos no naturales de aminoácidos en la secuencia peptídica. Por ejemplo, la alanina es a menudo sustituida por N-metil-alanina, y el ácido α -amino-isobutírico y el ácido α -amino-butírico son sustitutos de aminoácidos hidrófobos voluminosos. Otra técnica más es sustituir el resto de L-aminoácido de la secuencia peptídica por el correspondiente D-aminoácido. Por ejemplo, una alanina puede ser sustituida por D-alanina.

Se cree que los nuevos péptidos de giro β son útiles como agentes para potenciar la supervivencia, o inducir el crecimiento, de células nerviosas y musculares. Un péptido de giro β es útil, por supuesto, como un nuevo componente de medios de cultivo para uso en el cultivo de células nerviosas *in vitro*. Los péptidos del invento son también útiles como sustitutos de las citocinas naturales en muchos campos, incluyendo: en cirugía, como agentes que promueven la cicatrización de heridas y la regeneración; en ortopedia, para promover la reparación ósea y la integración de implantes; en odontología, en la reparación de defectos óseos y en la integración de implantes; en la quimioterapia del cáncer y en el tratamiento con radiaciones, como agentes citostáticos para la protección de células madre normales frente a procedimientos específicos del ciclo celular; en el tratamiento de la artritis reumatoide; en oftalmología, para la reparación de una lesión macular; en oftalmología, para el tratamiento de la uveítis; como un agente protector del daño por reperusión tras oclusión de arterias esplánicas; y como reactivos para investigación en la biología de los factores de crecimiento.

Las composiciones terapéuticas de este invento incluirán nuevos péptidos de giro β en concentraciones que dependerán de las dosis eficaces requeridas y los modos de administración usados. En seguida vendrán a la mente diversas indicaciones terapéuticas para las composiciones que contienen al menos un péptido de giro β . Una indicación es la aplicación tópica a incisiones o a tejido expuesto para la promoción de la cicatrización de heridas. Los tipos de heridas u otros traumas que pueden tratarse incluyen (pero no se limitan a): quemaduras de primer, segundo y tercer grado (especialmente de segundo y tercer grado), incisiones quirúrgicas epidérmicas e internas, incluyendo las de cirugía cosmética; heridas, incluyendo desgarros, incisiones y punzadas; y úlceras epidérmicas, incluyendo la úlcera por decúbito (llagas por presión) y las úlceras diabéticas, dentales, hemofílicas y varicosas.

Los usos pueden ser por una diversidad de métodos, tales como administración sistémica, aplicación tópica, administración intravenosa, administración subcutánea, inyección intraperitoneal, inyección subperiosteal, administración intratraqueal, liberación de polímeros o bombas, implantes, y liberación de liposomas. Los implantes adecuados (si se usa un dispositivo implantado) incluyen, por ejemplo, implantes basados en espuma de gel, cera o micropartículas. Las dosis utilizadas deben ser suficientes para que se alcancen concentraciones plasmáticas circulantes de ingrediente activo que sean eficaces. Las dosis eficaces pueden ser extrapoladas de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de ensayo *in vitro* o en modelos animales.

Los péptidos del invento son también útiles para inducir el crecimiento de hueso. De esta manera, pueden administrarse cantidades osteogénicamente eficaces de al menos un péptido de giro β en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable, para inducir el depósito y la maduración de hueso en el sitio. Además, el péptido o los péptidos pueden mezclarse con, o ser portados por, biomateriales, tal como el hidroxiapatito para aplicaciones de generación o reparación óseas en un método tal como el descrito en la Patente de EE.UU. 5.158.934, concedida el 27 de Octubre de 1.992, y la Patente de EE.UU. 5.208.219, concedida el 4 de Mayo de 1.993, mediante composiciones tales como las descritas en la Patente de EE.UU. 5.178.845, concedida el 12 de Enero de 1.993, todas incorporadas aquí por referencia.

Dichas composiciones para reparación ósea incluyen típicamente diversos materiales componentes de minerales de fosfato cálcico, tales como, por ejemplo, hidroxiapatitos comercialmente asequibles bajo las denominaciones Synt-hograft, Tricalcium Phosphate y Periogras. En lugar de ser adquirido comercialmente, el hidroxiapatito (o fosfato tricálcico) puede ser preparado mediante métodos conocidos, tales como los descritos por Termine *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.*, 140, TP307-325 (1.970). Dicho material puede ser suministrado en forma de polvo con tamaños de partícula preferidos, típicamente en el intervalo de aproximadamente 100-2.000 μm .

Otra indicación terapéutica para las composiciones que contienen al menos un péptido de giro β es junto con materiales formadores de matrices. Preferiblemente, las formulaciones incluyen una matriz que es capaz de proporcionar una estructura para el desarrollo de hueso y cartílago. Las posibles matrices pueden ser biodegradables o no biodegradables, y pueden estar química o biológicamente definidas.

Como un ejemplo, la matriz puede ser inerte, sólida y no porosa, tal como una de las conocidas y actualmente utilizadas como recipientes para cultivo celular. Otra forma que pueden tomar las matrices de este invento es la de polímeros solubles. Otras matrices adecuadas para la práctica de este invento incluyen diversos polímeros e hidrogeles. Dichos materiales compuestos son útiles para construir moldes para la reparación de tejidos blandos, para una rápida reposición de tejido perdido y para cirugía reconstructiva y plástica.

De este modo, los materiales compuestos del invento pueden ser preparados con polímeros reabsorbibles de diversas clases que tienen el péptido portado por, o injertado en, la red del material polímero. Por supuesto, son también posibles los soportes polímeros que están limitados en cuanto a las propiedades de reabsorción, tales como metacrilato

de hidroxietilo, poli(metacrilato de metilo) y N-vinilpirrolidona-metacrilato de metilo, como algunos ejemplos. Los materiales compuestos pueden ser luego implantados en el defecto tisular.

- Entre los hidrogeles reabsorbibles conocidos y adecuados están las combinaciones de polilactato y poliglicolato.
- 5 Los compuestos del invento pueden ser covalentemente unidos a dichos materiales durante la síntesis de los propios polímeros, o los polímeros pueden ser hidrolizados para que se disponga de sitios de fijación irradiando el polímero o activando químicamente el polímero para generar radicales libres. Luego pueden utilizarse técnicas convencionales para injertar o inmovilizar péptidos sobre soportes polímeros, para preparar los materiales compuestos del invento. Los polímeros o hidrogeles reabsorbibles así preparados son particularmente útiles para reconstrucciones de tejidos
- 10 blandos. Para reconstrucciones o reparaciones de tejidos duros (por ejemplo, reparaciones óseas), es deseable combinar dichas especies polímeras solubles en agua, o reabsorbibles, con un producto cerámico, tal como, por ejemplo, biovidrio, óxido de aluminio, aluminato cálcico, fosfato tricálcico o hidroxiapatito.

- Cuando se prepara un péptido de giro β para administración mediante mezclamiento con vehículos fisiológicamente aceptables, es decir, vehículos que son atóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, esto supone normalmente combinar el(los) péptido(s) del invento con tampones, antioxidantes tales como el ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, hidratos de carbono, incluyendo glucosa y dextrinas, agentes quelantes tales como EDTA, y otros excipientes. El péptido del invento para uso en administraciones terapéuticas debe ser estéril. Esto se consigue fácilmente por
- 20 filtración a través de membranas de filtración (0,22 μm) estériles.

- Los nuevos péptidos de giro β pueden ser administrados en cualquier vehículo farmacológicamente aceptable y, dependiendo del modo de administración deseado, pueden ser formulados junto con un vehículo líquido en preparaciones de liberación controlada y basadas en liposomas, microcápsulas, polímeros o ceras, o ser formulados en forma
- 25 de tabletas, píldoras o cápsulas.

- Los péptidos forman sales farmacéuticamente aceptables con ácidos orgánicos e inorgánicos y pueden ser administrados en forma de sal, o el nuevo péptido de giro β puede ser amidado. Los ejemplos de ácidos adecuados para la formación de sales farmacéuticamente aceptables son los ácidos clorhídrico, sulfúrico, fosfórico, acético, benzoico, cítrico, malónico, salicílico, málico, fumárico, succínico, tartárico, láctico, glucónico, ascórbico, maleico, bencenosulfónico, metanosulfónico, etanosulfónico, hidroximetanosulfónico e hidroxietanosulfónico.
- 30

- Pueden también formarse sales con adecuadas bases orgánicas farmacéuticamente aceptables. Estas bases orgánicas forman una clase cuyos límites son fácilmente entendidos por los expertos en la técnica. Meramente con fines de ilustración, puede decirse que la clase incluye mono-, di- y tri-alquilaminas, tales como metilamina, dimetilamina y trietilamina; mono-, di- y tri-hidroxialquilaminas, tales como mono-, di- y tri-etanolamina; aminoácidos tales como arginina y lisina; guanidina; N-metilglucosamina; N-metilglucamina; L-glutamina; N-metilpiperazina; morfolina; etilendiamina; N-bencilfenetilamina; tris(hidroximetil)aminometano; y similares [véase, por ejemplo, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.*, 66 (1), 1-19 (1.977)].
- 40

- Las formulaciones terapéuticas que contienen al menos un péptido de giro β , tal como para promover el crecimiento de células óseas, pueden ser preparadas para almacenamiento mezclando al menos uno de los nuevos péptidos, que tenga el grado deseado de pureza, con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables opcionales en forma de torta liofilizada o de disoluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizadores aceptables son
- 45 atóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas cuando se administran, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (inferior a aproximadamente 10 restos); y proteínas, tales como albúmina sérica, gelatina e inmunoglobulinas.

- Otros componentes pueden incluir glicocola, glutamina, asparagina, arginina y lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono, incluyendo glucosa, manosa y dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar tales como manitol y sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como el sodio; y/o agentes tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN, PLURONICS y PEG. Aún otros componentes útiles deseablemente incluidos en las formulaciones terapéuticas de citomodulina son uno o más factores de crecimiento distintos, tales como, por ejemplo,
- 55 el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).

- La dosificación inicial de los nuevos péptidos de giro β para aplicaciones tópicas, tal como para la cicatrización de heridas, debería ser proporcionada al sitio terapéutico en una concentración de aproximadamente 50 a 500 ng/ml y ser luego ajustada de acuerdo con la experiencia clínica. Puesto que las composiciones del invento proporcionan y mantienen la regeneración celular, está indicada una aplicación continua o una reaplicación periódica de las composiciones. Se espera que el clínico modifique la dosificación de acuerdo con la experiencia clínica.
- 60

- Las composiciones pueden ser usadas en forma de formulaciones estériles para irrigación, preferiblemente en combinación con una disolución salina fisiológica, o en forma de ungüentos o suspensiones, preferiblemente en combinación con otros factores de crecimiento como los anteriormente indicados, e incluso con colágeno, un compuesto análogo de colágeno o un compuesto mimético de colágeno, tal como describe, por ejemplo, el inventor Bhatnagar en Patente de EE.UU. 5.354.736, concedida el 11 de Octubre de 1.994 e incorporada aquí por referencia. Las composiciones pueden estar también impregnando parches transdérmicos, emplastos y vendas, preferiblemente en una forma
- 65

líquida o semilíquida. Deberían incluirse agentes antimicrobianos, tal como sulfadiazina de plata, en dichos artículos o composiciones.

Los péptidos de giro β pueden ser también administrados sistémicamente para el tratamiento de heridas y traumas similares. La administración sistémica es útil con tal que no haya efectos secundarios indeseables, o estos sean limitados, tal como la estimulación del crecimiento celular neoplásico en pacientes con cáncer. Las composiciones para administración sistémica son preferiblemente formuladas como infusiones o inyecciones parenterales, isotónicas y estériles.

Las composiciones del invento, como se describió anteriormente, sean con un péptido de giro β solo o sean de éste en combinación con otros factores de crecimiento, colágeno, y vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables como los descritos, pueden ser portadas por (o mezcladas con) una matriz biológicamente compatible. Las matrices del invento pueden ser porosas y estar en forma de glóbulos, partículas o fibras. Por ejemplo, se han sugerido materiales de fosfato cálcico, tales como productos cerámicos basados en apatito, para producir implantes tisulares porosos o materiales protésicos con microporos suficientes para permitir la fijación tisular. De esta forma, una aplicación terapéutica para las composiciones del invento es aquella en que el material formador de la matriz es biodegradable y puede ser usado, por ejemplo, en la reparación de cartílagos.

Los materiales matriciales útiles para rellenar o, si no, arreglar un defecto en el cartílago incluyen, por ejemplo, fibrinógeno (activado con trombina para formar fibrina en el defecto o la lesión), colágeno, gelatina y cualquier otro material biodegradable que forme una matriz con poros suficientemente grandes para permitir que células reparadoras ocupen la matriz y proliferen en ella, y que pueda resultar degradado y sustituido por cartílago durante el proceso de reparación.

Las matrices útiles en las composiciones y métodos de este invento pueden estar preformadas o pueden formarse *in situ*, por ejemplo, por polimerización de compuestos y composiciones, tal como la de fibrinógeno para formar una matriz de fibrina. Las matrices que pueden estar preformadas pueden incluir colágeno, compuestos análogos de colágeno o compuestos miméticos de colágeno (por ejemplo, esponjas de colágeno y lana de colágeno), colágeno químicamente modificado, glóbulos o esponjas de gelatina, sustancias formadoras de gel, cualquier otra sustancia compuesta o formadora de gel que esté compuesta de un material matricial biodegradable que rellene el defecto tisular u óseo y permita que células reparadoras ocupen la matriz, y mezclas de los compuestos anteriores.

Las actividades biológicas de los péptidos del invento serán ahora adicionalmente ilustradas mediante los ejemplos siguientes, que están destinados a ser ilustrativos y no restrictivos.

Ejemplo 1

Inhibición de la síntesis de DNA de células epiteliales Mv-1-Lu de pulmón de visón

Se evaluó el efecto del TGF- β y la citomodulina determinando la velocidad de incorporación de [^{3} H]timidina al DNA total insoluble en ácido y el número de células; véase, en general, Sampath *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 267, páginas 20.352-20.362 (1.992). Se determinaron las velocidades de síntesis de DNA en cultivos triplicados, después de un tratamiento de 24 horas con diferentes concentraciones (10^{-9} a 10^{-6} M) de TGF- β o citomodulina (que fue sintetizada mediante el método de Merrifield), añadiendo [metil- ^{3} H]timidina ($7,40 \times 10^4$ Bq/ml, $2,96 \times 10^6$ Bq/milimol) 6 horas antes de la terminación del cultivo. La incorporación fue finalizada por aspiración del medio y, después de tres lavados con disolución salina tamponada con fosfato, el DNA radiactivo precipitado con ácido tricloroacético (10%) fue extraído con dodecilsulfato sódico al 1,0% (peso/volumen), NaOH 0,1 M, y fue cuantificado mediante una cuenta de centelleo en estado líquido. Para la determinación del número de células, se sembraron 1×10^5 células en matraces con MEM que contenía FBS al 10%, y, después de 24 horas, se sustituyó el medio de crecimiento por medio exento de suero que contenía diferentes concentraciones de TGF- β y citomodulina. Se recolectaron cultivos triplicados cada 24 horas durante un total de 7 días, y se determinó el número de células contando las células liberadas por digestión con tripsina en un hemacitómetro de volumen fijo.

La curva de la citomodulina en cuanto a la inhibición del crecimiento era similar a la observada con el TGF- β para el mismo intervalo de concentraciones.

Ejemplo 2

Crecimiento y formación de colonias por fibroblastos NRK-49 F en agar blando

El ensayo original para el TGF- β , la capacidad para promover el crecimiento de fibroblastos normales, independiente del anclaje, es aún una de las características distintivas de la actividad TGF- β . Se cultivaron fibroblastos NRK-49 F a 37°C en DEM complementado con suero de ternera fetal al 10%. Los experimentos se llevaron a cabo con medio de cultivo, 10 ng/mg de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y 10 ng/ml de factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); sin embargo, a diferencia del TGF- β , que no induce la formación de colonias en ausencia de estos factores [véase, por ejemplo, Massagu, *J. Biol. Chem.*, 259, páginas 9.756-9.761 (1.984)], la citomodulina indujo la formación de colonias sin estos dos factores de crecimiento. Para esto, se añadió TGF- β 100 nM (testigo positivo) o citomodulina 100 nM. Se mezclaron los fibroblastos NRK-49 F (5×10^4 células/ml) con agar al 0,3% y se

sembró la mezcla en el fondo de placas de cultivo de 35 mm. Se observó formación de colonias a partir del día 3 de cultivo.

Como se esperaba, no se formaron colonias en los cultivos que sólo contenían el medio básico. Además, como se esperaba, en los cultivos con TGF- β crecieron colonias. Sorprendentemente, en los cultivos con citomodulina también se formaron colonias con un grado aproximadamente igual al de los cultivos con TGF- β . Las características de crecimiento de las colonias a lo largo del tiempo eran similares en los cultivos con TGF- β y los cultivos con citomodulina.

Con referencia a la Figura 2, se ilustran fotomicrografías que fueron tomadas el día 5 del cultivo de fibroblastos. La formación de colonias se observó realmente a partir del día 3 de cultivo. Como se ve en la Figura 2(A), pocas células sobrevivieron al cultivo en ausencia de factores de crecimiento. Las Figuras 2(B) y 2(C) muestran la formación de pequeñas colonias (flechas) en presencia de citomodulina; en el experimento de la Figura 2(C) también se habían incluido EGF y PDGF, por lo que se indujeron colonias mucho más grandes (flechas). Esto es análogo a la inducción de la formación de colonias por TGF- β salvo porque TGF- β requiere la presencia concomitante de factor de crecimiento epidérmico (EGF) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); sin embargo, como se ve en la Figura 2(B), la citomodulina sola indujo la formación de colonias.

Ejemplo 3

Aislamiento de RNA y análisis Northern

Se aisló el RNA celular total usando esencialmente el método descrito por Maniatis [Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Segunda Edición (1.989)]. Se lisaron las células con SDS al 0,5% y acetato potásico 0,1. El lisado fue sometido a extracción con fenol y fue centrifugado a 5.000 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa fue sometida a precipitación con 2 volúmenes de etanol en Tris 0,1 M, pH de 8,0, y NaCl 0,2 M. El sedimento fue resuspendido y fue cuantificado por medición de la absorbancia ultravioleta a 260 nm. La pureza del RNA fue evaluada comparando la absorbancia ultravioleta a 260 nm con aquella a 280 nm.

El RNA (10 μ g/carril) fue sometido a electroforesis en un campo de 3 a 4 V/cm a través de un gel desnaturalizante de agarosa al 0,7% y formaldehído 2,2 M. El RNA fue transferido por transferencia capilar a membranas de nailon. La integridad del RNA, la carga del gel y la eficacia de la transferencia fueron evaluadas por las bandas 28S y 18S teñidas con azul de metileno. Los filtros fueron secados en una estufa a 80°C durante 2 horas para inmovilizar el RNA. Después del secado, los filtros fueron sometidos a hibridación a 65°C en un tampón de NaPO₄ 0,5 M, pH de 7,0, que contenía EDTA 1 mM, dodecilsulfato sódico al 7% y albúmina sérica bovina al 1%. Las sondas de cDNA fueron marcadas con dDIG (sonda fluorescente) mediante el método del cebador aleatorio, usando la enzima de Klenow. Se llevó a cabo una hibridación a 65°C durante 18 horas, seguida de lavado.

Se analizaron los datos explorando la digoxigenina-dUTP de acuerdo con el procedimiento del fabricante (Boehringer Mannheim Biochemica, sistema DIG de marcación de DNA, n° 1175033 del catálogo).

Ejemplo 4

Giro β estable, necesario para la actividad

La Figura 5 muestra las coordenadas atómicas de la estructura bioactiva de la citomodulina (átomos 1-101). De este modo, la estructura representada por la Figura 5 describe el giro β que parece ser necesario para la actividad TGF- β . Sin limitación por la teoría, si el modelo de estructura-actividad es correcto, los compuestos análogos que tienen sustancialmente la misma estructura que la citomodulina también presentarán una actividad de tipo TGF- β . Similarmente, explotando los mecanismos de unión alostéricos, pueden sintetizarse compuestos con una actividad aumentada o disminuida con respecto a la actividad de la citomodulina.

Ejemplo 5

Usando la estructura tridimensional de la citomodulina (Figura 5) como una guía, se diseñaron dos compuestos análogos de citomodulina iniciales. Del estudio de la estructura se deduce que las características esenciales parecen ser la secuencia -Val-Ala- responsable del giro β estable, y una cadena lateral negativamente cargada poco después. En este punto, el perfil de estructura-actividad de trabajo era:

- (1) un aminoácido hidrófobo o neutro en la posición i ;
- (2) un aminoácido hidrófobo ramificado en la posición $i+1$;
- (3) un aminoácido alifático pequeño en la posición $i+2$, formando conjuntamente las posiciones $i+1$ e $i+2$ la estructura de giro β crítica; y
- (4) una cadena lateral negativamente cargada poco después, en $i+3$ o $i+4$ si $i+3$ es una prolina.

ES 2 270 453 T3

Para probar esta hipótesis, se sintetizaron y ensayaron dos compuestos análogos de citomodulina: Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Lys (ID. SEC. nº 2 o L2) y Leu-Ile-Ala-Pro-Glu-Ala (ID. SEC. nº 3 o L1). En ambos péptidos, se substituyó -Val-Ala- por -Ile-Ala- y se substituyó la secuencia de los dos primeros aminoácidos N-terminales de la citomodulina por leucina. En la ID. SEC. nº 3, hay ácido glutámico en la posición $i+3$ ya que es la primera cadena lateral después de la estructura de giro β . En la ID. SEC. nº 4, hay prolina en la posición $i+3$. Puesto que la prolina no tiene una "cadena lateral", el ácido glutámico se colocó en la posición $i+4$.

Ambos compuestos análogos de citomodulina, L1 y L2, presentaban al menos tanta actividad de tipo TGF- β como la citomodulina; promovían el crecimiento de células NRK-49F en agar blando e inhibían la proliferación de células MV-1-Lu (véase la Figura 6); aumentaban la expresión de colágeno de tipo I y TGF- β (véase la Figura 7) y disminuían la expresión de collagenasa en fibroblastos dérmicos humanos. Además, como la citomodulina, L1 y L2 también aumentaban la expresión de colágeno de tipo I, TGF- β y fosfatasa alcalina en células HOS.

Ejemplo 6

Se prepararon compuestos análogos de la ID. SEC. nº 2 y la ID. SEC. nº 3 para sonar más las necesidades de secuencia para la actividad de tipo TGF- β . Con este fin, se prepararon los péptidos siguientes:

20	Leu-Aib-Ala-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. nº 4)
	Leu-Ile-(Nme-Ala)-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. nº 5)
	Leu-Abu-Ala-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. nº 6)
25	Gly-Gly-Gln-Ile-Ala-Asn-Ile	(ID. SEC. Nº 7)
	Glu-Gly-Ile-Ala-Gly-Lys	(ID. SEC. Nº 8)
30	Leu-Ile-Ala-Asp-Ala-Lys	(ID. SEC. Nº 9)
	Leu-Ile-Ala-Asn-Ala-Lys	(ID. SEC. Nº 10)
	Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Ala	(ID. SEC. Nº 11)
35	Leu-Ile-Ala-Gln-Ala-Lys	(ID. SEC. Nº 12)
	Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Glu	(ID. SEC. Nº 13)
40	Leu-Ile-Ala-Gly-Glu-Gly	(ID. SEC. Nº 14)
	Ala-Asn-Val-Ala-Glu-Lys	(ID. SEC. Nº 15)
45	Leu-Ile-Ala-Lys-Gly-Lys	(ID. SEC. nº 16)

De los aminoácidos no estándares, Aib es ácido α -aminoisobutírico, Nme-Ala es N-metil-alanina y Abu es ácido α -aminobutírico.

Las ID. SEC. números 4-6, que son variantes menores de la ID. SEC. nº 2, mimetizaron las actividades biológicas del TGF- β y la citomodulina, como se muestra por la inhibición de la proliferación de células epiteliales Mv-1-Lu y la expresión aumentada de colágeno I y TGF- β en células HOS. En la Tabla 1 se muestran los datos de incorporación de timidina de las muestras para las ID. SEC. números 4-6.

TABLA 1

Inhibición de la incorporación de ³H-timidina en células MV-1 Lu en presencia de péptidos de ensayo

Testigo (sin péptidos añadidos)	Radiactividad- ³ H, 10 ³ dpm (% de inhibición)	3,57 (-)
(IV) LAibAEAK (ID. SEC. nº 4)		
1 nM	2,60 (27 %)	
5 nM	2,31 (35 %)	
50 nM	1,94 (46 %)	
100 nM	1,44 (60 %)	
500 nM	1,61 (55 %)	
(V) LINmeAEAK (ID. SEC. nº 5)		
1 nM	1,61 (47 %)	
5 nM	1,76 (42 %)	
50 nM	1,60 (41 %)	
100 nM	1,81 (40 %)	
500 nM	1,42 (53 %)	
(VI) LABuAEAK (ID. SEC. nº 6)		
1 nM	2,02 (33 %)	
5 nM	1,97 (35 %)	

Sin embargo, las ID. SEC. números 7-8 no presentaban una actividad TGF- β significativa. Esto no resultó inesperado, dado el modelo de trabajo. En la ID. SEC. nº 7 no está presente un aminoácido con una cadena lateral negativamente cargada. Aunque está presente un ácido glutámico en la ID. SEC. nº 8, está en la parte N-terminal del giro β y no en la parte C-terminal, como ocurre con la citomodulina, L1 y L2.

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la inhibición de la incorporación de ³H-timidina para las ID. SEC. números 9-16. Los números mostrados para las diversas concentraciones son relaciones del índice de inhibición del péptido que se ensaya con respecto al índice de inhibición de la citomodulina (ID. SEC. nº 1) en la misma concentración. Puesto que la citomodulina inhibe la proliferación de células MV-1-Lu al menos tanto como el TGF- β , se usó citomodulina y no TGF- β como testigo.

TABLA 2

Actividad inhibidora del crecimiento de péptidos del invento

Composición del péptido		Inhibición por comparación con citomodulina (Inh. por nuevo péptido/Inh. por citomodulina)			
	Concentración (nM)	1	10	100	1.000
LIADAK	ID. SEC. nº 9	0,45	0,87	1,14	1,25
LIANAK	ID. SEC. nº 10	1,70	2,00	1,43	3,05
LIAEAA	ID. SEC. nº 11	1,16	1,00	1,17	1,85
LIAQAK	ID. SEC. nº 12	0,90	1,10	0,80	1,56
LIAGGE	ID. SEC. nº 13	1,10	1,33	1,45	1,90
LIAGEG	ID. SEC. nº 14	0,66	0,85	1,41	1,88
ANVAEK	ID. SEC. nº 15	—	0,80	1,00	—
LIAKGK	ID. SEC. nº 16	—	0,65	0,67	—

ES 2 270 453 T3

Como se ilustra mediante la Tabla 2, todos los péptidos con las secuencias representadas por las ID. SEC. números 9-16 inhibían al menos cierta cantidad de la incorporación de timidina. A partir de estos resultados, parece que el modelo general para preparar péptidos con actividad TGF- β funciona sorprendentemente bien.

En particular, un péptido es especialmente digno de mención. La ID. SEC. n° 10, Leu-Ile-Ala-Asn-Ala-Lys, inhibía la proliferación de células epiteliales Mv-1-Lu aún más que la citomodulina en cada concentración ensayada. Puesto que la ID. SEC. n° 10 no contiene una cadena lateral negativamente cargada, estaba claro que había que redefinir el modelo de trabajo. Basándose en las actividades de inhibición tanto de la ID. SEC. n° 10 como de la ID. SEC. n° 12, en las que asparagina y glutamina reemplazaban al ácido glutámico, parece que el grupo carbonilo (C=O) es la característica crítica y no necesariamente el grupo ácido carboxílico completo (COO-).

Otro conjunto interesante de péptidos es el de las ID. SEC. números 13-14, con las que se exploran las necesidades posicionales del grupo carbonilo. Parece que las actividades de estos péptidos son el resultado de la excepcional flexibilidad de la cadena principal de glicocola. Puesto que la cadena principal de glicocola puede adoptar casi todos los ángulos de torsión admisibles, una cadena lateral que contuviera carbonilo y estuviera dispuesta próxima a la estructura de giro β podría alcanzar su conformación necesaria sin incurrir en un coste energético significativo. Puesto que la ID. SEC. n° 13 es más flexible que la ID. SEC. n° 14, no es sorprendente que la ID. SEC. n° 13 inhiba más la incorporación de timidina que la ID. SEC. n° 14.

Otra característica digna de mención incluye la ID. SEC. n° 11. Puesto que este péptido presenta al menos tanta actividad como la citomodulina, está claro que la lisina C-terminal de L1 y L2 no es importante. Como resultado, parece que la relación de estructura-actividad necesaria para la actividad TGF- β es:

- (1) un aminoácido hidrófobo o neutro en la posición i ;
- (2) un aminoácido hidrófobo ramificado en la posición $i+1$ (es decir, Val, Ile);
- (3) un aminoácido alifático pequeño en la posición $i+2$ (es decir, Ala), formando conjuntamente las posiciones $i+1$ e $i+2$ la estructura de giro β crítica; y
- (4) una cadena lateral que contiene carbonilo poco después.

Ha de entenderse que, aunque el invento ha sido anteriormente descrito junto con realizaciones específicas preferidas, la descripción y los ejemplos están destinados a ilustrar, y no a limitar, el alcance del invento, que se define por el alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Un péptido que tiene la secuencia $AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}$ como una secuencia inicial que define el extremo N o que tiene dicha secuencia después de alanina como extremo N, teniendo además el péptido un AA_{i+n} adyacente o próximo a dicha secuencia en la dirección del extremo C, en que n es 3, 4 ó 5 de modo que el péptido contiene n-3 restos de aminoácido adicionales entre AA_{i+2} y AA_{i+n} , y en que

AA_i es alanina, asparagina o leucina,

AA_{i+1} es valina o isoleucina, ácido α -amino-isobutírico o ácido α -amino-butírico,

AA_{i+2} es alanina o N-metil-alanina, y

AA_{i+n} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina, por lo que el péptido forma una estructura de giro β estable en condiciones fisiológicas bajo la cual el TGF- β tiene un giro β estable y promueve al menos una actividad biológica de TGF- β .

2. Un péptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en que n es 3 y la secuencia peptídica comprende además $AA_{i+4}-AA_{i+5}$ en que AA_{i+4} y AA_{i+5} son alanina.

3. Un péptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en que n es 4 y el resto de aminoácido entre AA_{i+2} y AA_{i+n} es prolina o glicocola.

4. Un péptido de acuerdo con la Reivindicación 1, en que n es 5 y los dos restos de aminoácido entre AA_{i+2} y AA_{i+n} son glicocola.

5. Un péptido biológicamente activo seleccionado entre:

Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 2),
Leu-Ile-Ala-Pro-Glu-Ala	(ID. SEC. n° 3),
Leu-Aib-Ala-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 4),
Leu-Ile-(N-metil-Ala)-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 5),
Leu-Abu-Ala-Glu-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 6),
Leu-Ile-Ala-Asp-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 9),
Leu-Ile-Ala-Asn-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 10),
Leu-Ile-Ala-Glu-Ala-Ala	(ID. SEC. n° 11),
Leu-Ile-Ala-Gln-Ala-Lys	(ID. SEC. n° 12),
Leu-Ile-Ala-Gly-Gly-Glu	(ID. SEC. n° 13),
Leu-Ile-Ala-Gly-Glu-Gly	(ID. SEC. n° 14), y
Ala-Asn-Val-Ala-Glu-Lys	(ID. SEC. n° 15).

6. Una formulación farmacéutica que comprende:

(i) un vehículo fisiológicamente aceptable, y

(ii) un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

7. Una formulación de acuerdo con la Reivindicación 6, en la que el péptido está en forma de una sal.

8. Una composición que comprende:

(i) una matriz biocompatible, y

- (ii) un péptido que tiene la secuencia $AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}$ como una secuencia inicial que define el extremo N o que tiene dicha secuencia después de alanina como extremo N, teniendo además el péptido un AA_{i+n} adyacente o próximo a dicha secuencia en la dirección del extremo C, en que n es 3, 4 ó 5 de modo que el péptido contiene n-3 restos de aminoácido adicionales entre AA_{i+2} y AA_{i+n} , y en que

AA_i es alanina, asparagina o leucina,

AA_{i+1} es valina, isoleucina, ácido α -amino-isobutírico o ácido α -amino-butírico,

AA_{i+2} es alanina, y

AA_{i+n} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina, por lo que el péptido forma una estructura de giro β estable en condiciones fisiológicas bajo la cual el TGF- β tiene un giro β estable, estando el péptido mezclado con, o portado por, la matriz y en una cantidad eficaz para promover el crecimiento celular, incluyendo la matriz opcionalmente Ala-Asn-Val-Ala-Glu-Asn-Ala (ID. SEC. nº 1).

9. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 8, en la que n es 3 y la secuencia peptídica comprende además $AA_{i+4}-AA_{i+5}$ en que AA_{i+4} y AA_{i+5} son alanina.

10. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 8, en la que n es 4 y el resto de aminoácido entre AA_{i+2} y AA_{i+n} es prolina o glicocola.

11. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 6, en la que n es 5 y los dos restos de aminoácido entre AA_{i+2} y AA_{i+n} son glicocola.

12. Una composición que comprende:

(i) una matriz biocompatible, y

(ii) un péptido de acuerdo con la Reivindicación 5, en la que el péptido está mezclado con, o es portado por, la matriz en una cantidad eficaz para promover el crecimiento celular.

13. Una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 12, en la que la matriz biocompatible es biodegradable.

14. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 13, en la que la matriz incluye un polímero reabsorbible.

15. Una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 12, en la que la matriz biocompatible es no biodegradable.

16. Una composición de acuerdo con la Reivindicación 15, en la que la matriz es porosa.

17. Un péptido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o una composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 6 ó 7, para uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o animal.

18. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o de una composición farmacéutica de acuerdo con la Reivindicación 6 ó 7, en la fabricación de un medicamento para uso en cirugía como un agente para promover la cicatrización de heridas y la regeneración, en ortopedia para promover la reparación ósea y la integración de implantes, en odontología para promover la reparación de defectos óseos y la integración de implantes; en la quimioterapia del cáncer y en el tratamiento con radiaciones como un agente citostático para la protección de células madre normales frente a procedimientos específicos del ciclo celular, en el tratamiento de la artritis reumatoide, en oftalmología para promover la reparación de una lesión macular, en oftalmología para el tratamiento de la uveítis, o como un agente protector del daño por reperfusión tras oclusión de arterias esplácnicas.

19. Una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 16, para uso en un método de reparación tisular.

20. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 16, en la fabricación de un medicamento para reparación tisular.

21. Una formulación farmacéutica que comprende:

(i) un compuesto mimético de TGF- β , distinto de A-N-V-A-E-N-A, que tiene la secuencia $AA_i-AA_{i+1}-AA_{i+2}$ como una secuencia inicial que define el extremo N o que tiene dicha secuencia después de alanina como extremo N, teniendo además el compuesto mimético un AA_{i+n} adyacente o próximo a dicha secuencia en la dirección del extremo C, en que n es 3, 4 ó 5 de modo que el péptido contiene n-3 restos de aminoácido adicionales entre AA_{i+2} y AA_{i+n} , y en que

ES 2 270 453 T3

AA_i es alanina, asparagina o leucina,

AA_{i+1} es valina o isoleucina, ácido α -amino-isobutírico o ácido α -amino-butírico,

5 AA_{i+2} es alanina o N-metil-alanina, y

AA_{i+n} es ácido glutámico, ácido aspártico, glutamina o asparagina, por lo que el compuesto mimético promueve al menos una actividad biológica de TGF- β ; y

10 (ii) colágeno, un compuesto análogo de colágeno o un compuesto mimético de colágeno.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG. 1

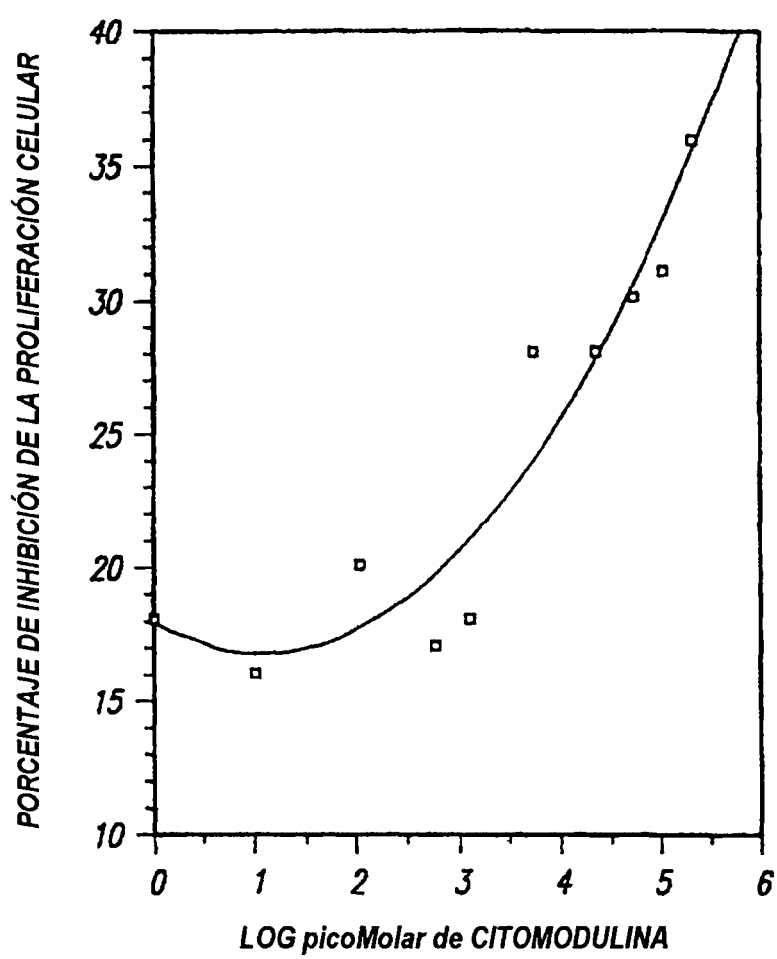


FIG. 2A
TESTIGO



FIG. 2B

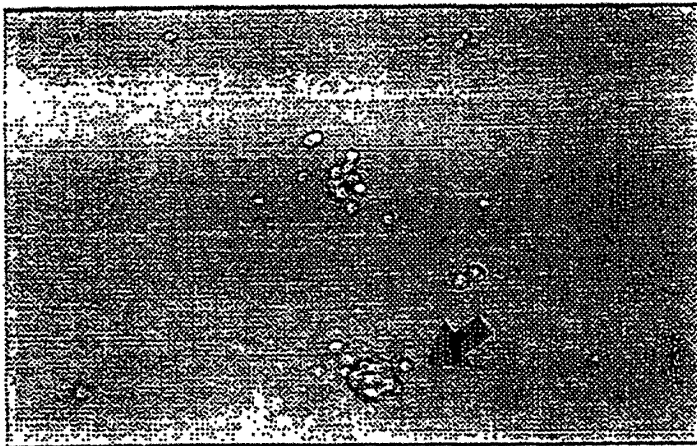


FIG. 2C



FIG. 3A

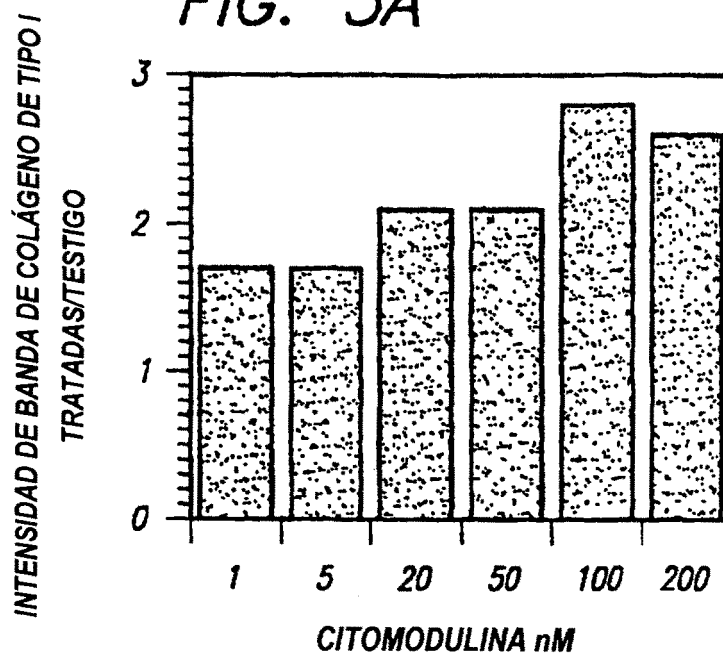


FIG. 3B

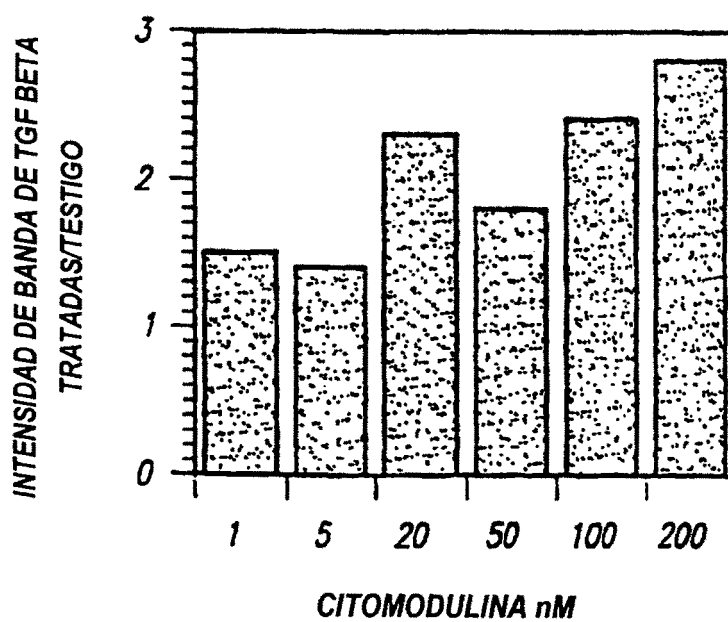


FIG. 3C

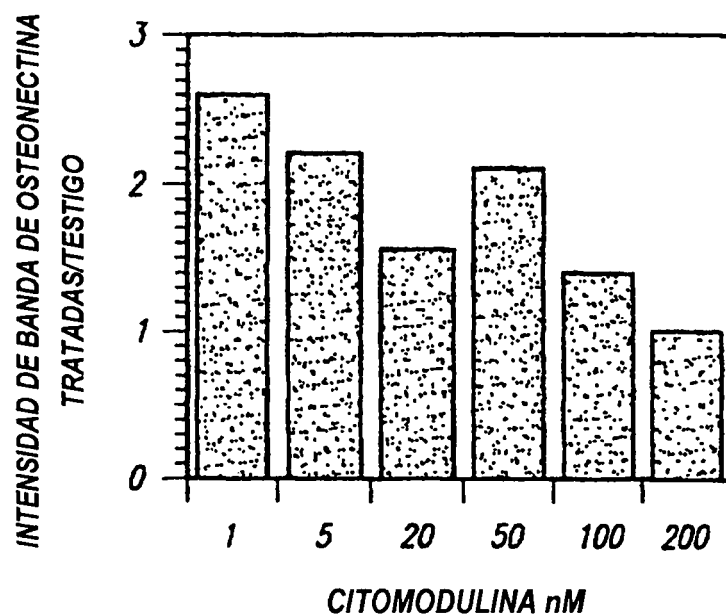


FIG. 3D

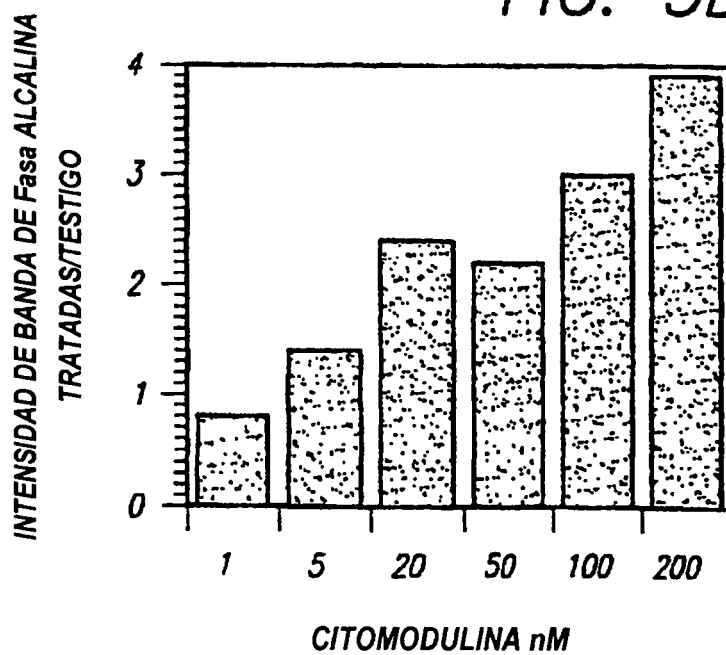


FIG. 4B

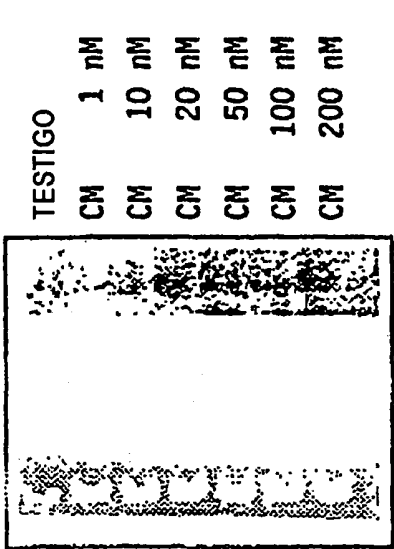


FIG. 4D

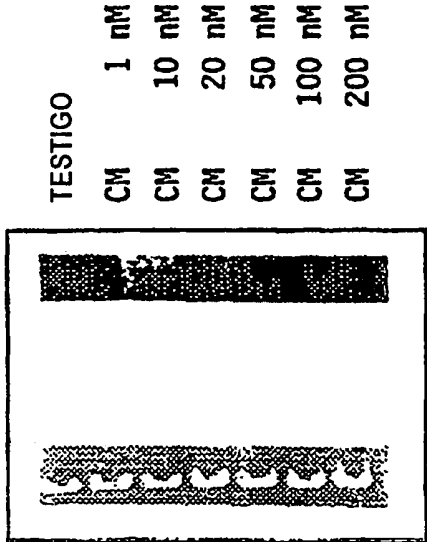


FIG. 4A

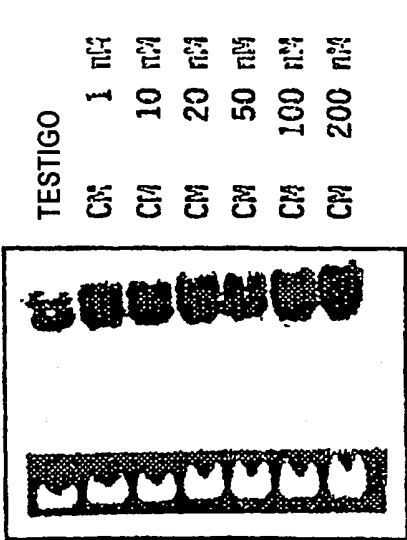


FIG. 4C

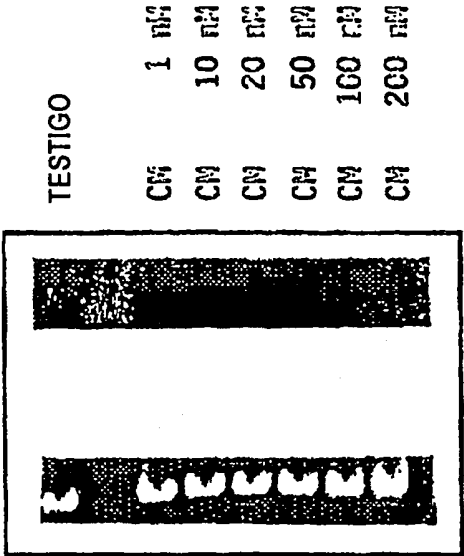


FIG. 5-1

1	H1	ACE	1	1.952	1.249	.316
2	CH3	ACE	1	1.927	2.333	.203
3	H2	ACE	1	1.576	2.782	1.133
4	H3	ACE	1	1.243	2.593	-.605
5	C	ACE	1	3.323	2.853	-.119
6	O	ACE	1	4.272	2.077	-.210
7	N	ALA	2	3.439	4.166	-.310
8	HN	ALA	2	2.632	4.767	-.211
9	CA	ALA	2	4.695	4.857	-.543
10	HA	ALA	2	5.425	4.521	.195
11	CB	ALA	2	5.211	4.572	-1.957
12	HB1	ALA	2	4.475	4.894	-2.694
13	HB2	ALA	2	6.142	5.115	-2.122
14	HB3	ALA	2	5.399	3.506	-2.083
15	C	ALA	2	4.443	6.350	-.361
16	O	ALA	2	3.292	6.788	-.383
17	N	ASN	3	5.504	7.130	-.187
18	HN	ASN	3	6.426	6.699	-.147
19	CA	ASN	3	5.484	8.570	.015
20	HA	ASN	3	4.836	9.029	-.733
21	CB	ASN	3	4.964	8.871	1.432
22	HB2	ASN	3	5.670	8.464	2.158
23	HB3	ASN	3	4.000	8.383	1.578
24	CG	ASN	3	4.760	10.357	1.704
25	OD1	ASN	3	4.723	11.177	.792
26	ND2	ASN	3	4.654	10.739	2.969
27	HND1	ASN	3	4.656	10.052	3.709
28	HND2	ASN	3	4.487	11.714	3.168
29	C	ASN	3	6.925	9.054	-.180
30	O	ASN	3	7.816	8.242	-.407
31	N	VAL	4	7.196	10.354	-.082
32	HN	VAL	4	6.433	11.007	.038
33	CA	VAL	4	8.563	10.863	-.110
34	HA	VAL	4	9.001	10.579	-1.068
35	CB	VAL	4	8.546	12.404	-.038
36	HB	VAL	4	7.922	12.763	-.857
37	CG1	VAL	4	7.958	12.951	1.272
38	HG11	VAL	4	8.590	12.684	2.119
39	HG12	VAL	4	7.900	14.038	1.213
40	HG13	VAL	4	6.955	12.563	1.438
41	CG2	VAL	4	9.949	12.988	-.245
42	HG21	VAL	4	10.376	12.608	-1.174
43	HG22	VAL	4	9.889	14.075	-.306
44	HG23	VAL	4	10.605	12.718	.583

FIG. 5-2

45	C	VAL	4	9.414	10.217	.994
46	O	VAL	4	10.604	9.986	.807
47	N	ALA	5	8.808	9.966	2.157
48	HN	ALA	5	7.829	10.176	2.244
49	CA	ALA	5	9.520	9.482	3.331
50	HA	ALA	5	10.411	10.096	3.479
51	CB	ALA	5	8.626	9.645	4.563
52	HB1	ALA	5	7.723	9.042	4.457
53	HB2	ALA	5	9.169	9.314	5.450
54	HB3	ALA	5	8.350	10.693	4.688
55	C	ALA	5	9.968	8.025	3.185
56	O	ALA	5	11.076	7.684	3.587
57	N	GLU	6	9.079	7.168	2.682
58	HN	GLU	6	8.245	7.512	2.233
59	CA	GLU	6	9.204	5.720	2.725
60	HA	GLU	6	10.254	5.429	2.779
61	CB	GLU	6	8.456	5.210	3.964
62	HB2	GLU	6	7.393	5.439	3.867
63	HB3	GLU	6	8.837	5.712	4.854
64	CG	GLU	6	8.602	3.703	4.203
65	HG2	GLU	6	9.655	3.443	4.313
66	HG3	GLU	6	8.176	3.138	3.375
67	CD	GLU	6	7.861	3.290	5.467
68	OE1	GLU	6	6.706	3.745	5.612
69	OE2	GLU	6	8.468	2.548	6.266
70	C	GLU	6	8.583	5.188	1.438
71	O	GLU	6	7.633	5.781	.930
72	N	ASN	7	9.123	4.107	.882
73	HN	ASN	7	9.827	3.588	1.392
74	CA	ASN	7	8.673	3.542	-.382
75	HA	ASN	7	7.595	3.676	-.478
76	CB	ASN	7	9.390	4.236	-1.545
77	HB2	ASN	7	10.466	4.108	-1.419
78	HB3	ASN	7	9.155	5.301	-1.530
79	CG	ASN	7	8.962	3.664	-2.892
80	OD1	ASN	7	7.842	3.197	-3.055
81	ND2	ASN	7	9.840	3.699	-3.887
82	HND1	ASN	7	10.757	4.091	-3.746
83	HND2	ASN	7	9.556	3.315	-4.774
84	C	ASN	7	8.974	2.049	-.371
85	O	ASN	7	9.950	1.634	.253
86	N	ALA	8	8.148	1.245	-1.035
87	HN	ALA	8	7.449	1.658	-1.644

FIG. 5-3

88	CA	ALA	8	8.215	-.205	-1.003
89	HA	ALA	8	9.244	-.529	-.837
90	CB	ALA	8	7.341	-.717	.150
91	HB1	ALA	8	6.300	-.440	-.024
92	HB2	ALA	8	7.415	-1.800	.241
93	HB3	ALA	8	7.675	-.269	1.087
94	C	ALA	8	7.762	-.755	-2.355
95	D	ALA	8	7.562	-.002	-3.304
96	N	NME	9	7.602	-2.077	-2.453
97	HN	NME	9	7.783	-2.641	-1.638
98	CT	NME	9	7.166	-2.736	-3.673
99	HT1	NME	9	6.431	-2.126	-4.201
100	HT2	NME	9	8.026	-2.904	-4.322
101	HT3	NME	9	6.712	-3.695	-3.424

FIG. 6

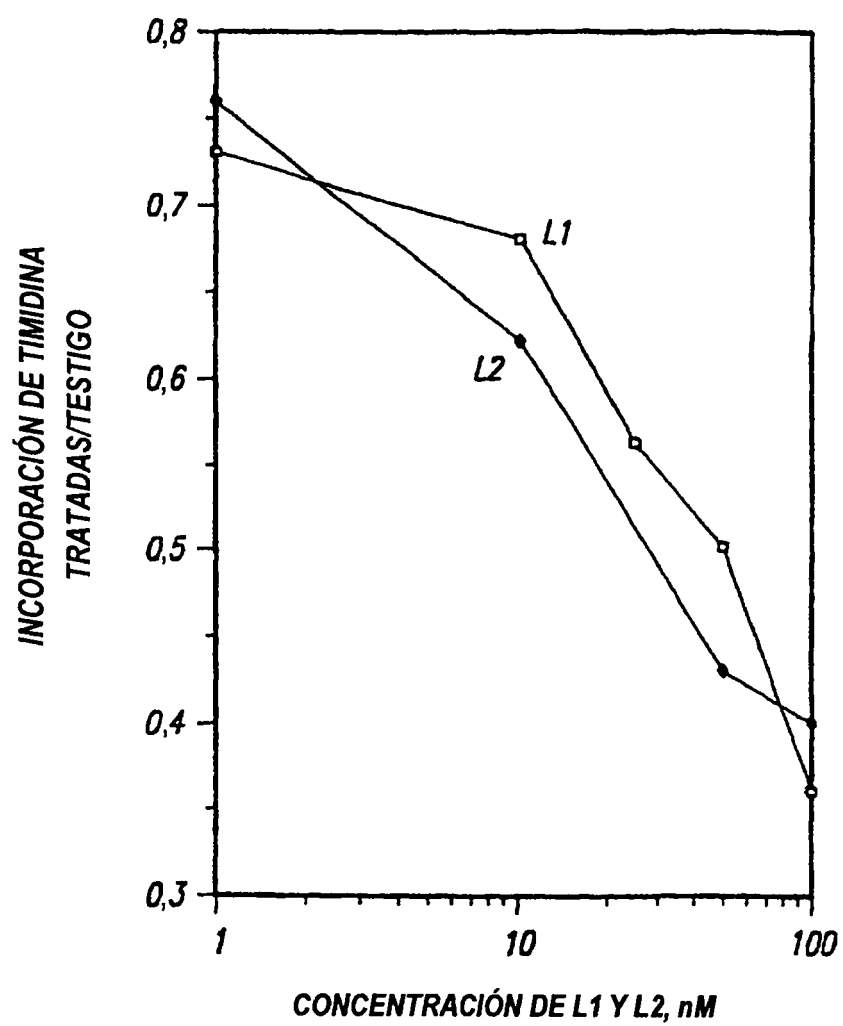
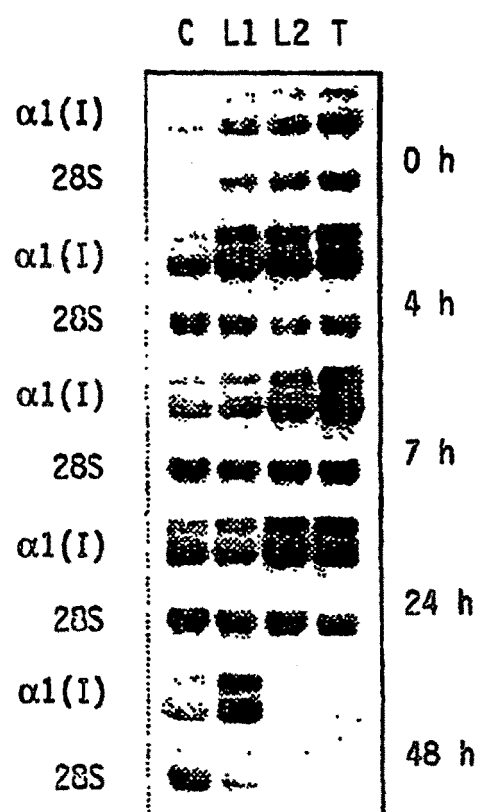


FIG. 7



ES 2 270 453 T3

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE: Los Rectores de la Universidad de California
- (ii) TÍTULO DEL INVENTO: Composiciones peptídicas con actividad de tipo factor de crecimiento
- (iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 16
- 10 (iv) DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA:
- (A) DESTINATARIO: Robbins, Berliner & Carson, LLP
- (B) CALLE: 201 N, Figueroa Street, 5th Floor
- 15 (C) CIUDAD: Los Angeles
- (D) ESTADO: California
- (E) PAÍS: Estados Unidos de América
- 20 (F) CÓDIGO POSTAL: 90012-2628
- (v) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquete
- (B) ORDENADOR: Compatible con ordenador personal IBM
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn, emisión nº 1.0, versión nº 1.30
- (vi) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:
- 30 (A) NÚMERO DE SOLICITUD:
- (B) FECHA DE PRESENTACIÓN:
- (C) CLASIFICACIÓN:
- 35 (viii) INFORMACIÓN SOBRE EL ABOGADO/AGENTE DE PATENTES:
- (A) NOMBRE: Berliner, Robert
- (B) NÚMERO DE REGISTRO: 20,121
- 40 (C) NÚMERO DE REFERENCIA/EXPEDIENTE: 5555-461
- (ix) INFORMACIÓN SOBRE TELECOMUNICACIONES:
- (A) TELÉFONO: (213) 977-1001
- 45 (B) TELEFAX: (213) 977-1003

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 1:

- (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- 50 (A) LONGITUD: 7 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (C) CLASE DE CADENA:
- 55 (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 1:
- 60 Ala Asn Val Ala Glu Asn Ala
- 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos

ES 2 270 453 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 2:

10 Leu Ile Ala Glu Ala Lys
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 3:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 3:

 Leu Ile Ala Pro Glu Ala
 1 5

30 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

35

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 4:

45 Leu Xaa Ala Glu Ala Lys
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 5:

60 Leu Ile Xaa Glu Ala Lys
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 6:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

ES 2 270 453 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 6:

10

Leu Xaa Ala Glu Ala Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 7:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 7 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 7:

Gly Gly Gln Ile Ala Asn Ile
1 5

30

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

35

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 8:

45

Glu Gly Ile Ala Gly Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 9:

50

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 9:

60

Leu Ile Ala Asp Ala Lys
1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 10:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

ES 2 270 453 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 10:

10 Leu Ile Ala Asn Ala Lys
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 11:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 11:

 Leu Ile Ala Glu Ala Ala
 1 5

30 (2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

35

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 12:

45 Leu Ile Ala Gln Ala Lys
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 13:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

50

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

55

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 13:

60 Leu Ile Ala Gly Gly Glu
 1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 14:

65

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

ES 2 270 453 T3

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

5

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 14:

10

Leu Ile Ala Gly Glu Gly
1 5

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 15:

15

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

20

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 15:

Ala Asn Val Ala Glu Lys
1 5

30

(2) INFORMACIÓN SOBRE LA ID. SEC. nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

35

(B) TIPO: aminoácido

(C) CLASE DE CADENA:

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. nº 16:

45

Leu Ile Ala Lys Gly Lys
1 5

50

55

60

65