



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 273 492**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/715** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99926326 .2**  
86 Fecha de presentación : **18.05.1999**  
87 Número de publicación de la solicitud: **1078001**  
87 Fecha de publicación de la solicitud: **19.01.2000**

54 Título: **Péptidos antagonistas de IL-6.**

30 Prioridad: **18.05.1998 EP 98108997**

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

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

73 Titular/es:  
**Applied Research Systems ARS Holding N.V.**  
**Pietermaai 15**  
**Curaçao, AN**

72 Inventor/es: **Serlupi-Crescenzi, Ottaviano;**  
**Bressan, Alessandro;**  
**Della Pietra, Linda y**  
**Pezzotti, Anna, Rita**

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

Péptidos antagonistas de IL-6.

## 5 Campo del invento

El presente invento se refiere a los péptidos antagonistas de IL-6, aislables de una librería peptídica a través del sistema de doble híbrido por su capacidad para unirse al dominio intracelular de gp130 y que contiene al menos 5 aminoácidos. En particular, tales péptidos comprenden una secuencia aminoacídica, que es seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6, así como sales, derivados funcionales, precursores y análogos de los mismos.

Otro objeto del presente invento es proporcionar el péptido en forma sustancialmente purificada, para que sea adecuado para usar en composiciones farmacéuticas, como ingrediente activo, en patologías que requieren la inhibición de la actividad de IL-6.

## 15 Antecedentes del invento

El sistema de doble híbrido (THS) es un método que usa la actividad transcripcional como un sistema para detectar las interacciones proteína-proteína. Una fusión génica es construida para codificar el dominio de unión a ADN del factor de transcripción GAL4 como un híbrido con cualquier proteína "X" (normalmente una proteína de mamífero definida que es la diana "cebo" de unión). Una construcción de fusión génica adicional codificará el dominio de activación de la transcripción de GAL4 fusionado a cualquier proteína "Y" (normalmente una librería de diversas proteínas, el "pez") (Fields y otros, 1994). Siempre que una interacción X-Y tiene lugar, traerá el dominio de activación cerca de los sitios sobre el ADN reconocido por el dominio de unión al ADN GAL4, resultando por lo tanto en la expresión de un gen reportero flanqueante regulado por estos sitios de ADN. Los genes reporteros comúnmente usados incluyen: 1) lacZ, que produce colonias azules sobre placas o filtros que contienen X-Gal; y 2) His3, un gen de levadura implicado en la biosíntesis de histidina, requerida por el crecimiento de células de levadura hospedadoras.

Recientemente, Fields y su equipo ha usado el THS para cribar una librería de péptidos aleatorios, en lugar de una librería de cADN, para encontrar los péptidos capaces de unir la proteína retinoblastoma (Rb) (Yang y otros, 1995).

El sistema receptor para la interleuquina 6 (IL-6) está compuesto por dos "subunidades" receptoras distintas designadas gp80 y gp130 (véase Hirano y otros, 1994).

Las citoquinas de tipo IL-6 generan sus señales a través de los receptores que comparten la proteína gp130. Tras la unión del ligando gp130 homo- o heterodimeriza con el receptor LIF y OSM, activando de ese modo las tirosina quinasas JAK asociadas. Las JAKs fosforilan el transductor de señales (gp130) y los factores de transcripción latentes de la familia STAT (Transductores de señales y activadores de la transcripción) como STAT1 y STAT3 en el caso de IL-6. Los factores STAT dimerizan, translocan al núcleo y se unen a los elementos potenciadores de los genes de respuesta a IL-6 (Lüttiken y otros, 1993).

El análisis de delección del dominio intracelular de gp130 ha definido extensiones cortas de aminoácidos conocidas como box1 y box2 suficientes para impartir tanto la actividad mitogénica como de unión de las proteínas JAK (Vanderkuur y otros, 1994); estas actividades fueron también observadas cuando los sitios de unión de STATs fueron deletados. Por lo tanto dos funciones pueden ser atribuidas a las quinasas JAK: 1) activación de la expresión de genes mediados por STAT; 2) activación de la actividad mitogénica independiente de STAT al menos en algunas células hematopoyéticas.

Se conoce que las quinasas adicionales se asocian con la porción intracelular de gp130, tal como Hck, Fes, Btk y Tec (Matsuda y otros, 1995). Sin embargo estas interacciones no han sido elucidadas en el nivel molecular. Por otro lado, Tanner y otros, han demostrado que el dominio box1 de los receptores de citoquinas es requerido pero no suficiente para la interacción con las JAK quinasas y ha sugerido que las secuencias box1 cooperan con otras secuencias de dominios citoplasmáticos para efectuar la asociación con la quinasa JAK (Tanner y otros, 1995). Aún la contrapartida molecular sobre las quinasas JAK de box1 y box2 no ha sido definida.

Los péptidos sintéticos que inhiben la actividad IL-6 han sido descritos en la Solicitud de Patente Internacional WO 97/13781 (YEDA), que se refiere a péptidos derivados de la proteína gp80. La Solicitud de Patente Internacional WO97/48728 describe nueve péptidos derivados de IL-6 y receptor de IL-6, que aparentemente tienen un actividad antagonista o agonista de IL-6.

## Descripción del invento

Como diana en el THS, los autores han analizado la porción intracelular del receptor de IL-6 humano (gp130-ICD). Este cribado por THS debería por lo tanto identificar péptidos candidatos que son capaces de interaccionar directamente con gp130-ICD en una manera independiente de fosforilación. Las interacciones independientes de fosforilación con gp130-ICD se conoce que tienen lugar en la transducción de la señal generada por las citoquinas de tipo IL-6.

Los homólogos de este tipo que interaccionan con gp130-ICD incluyen proteínas quinasas de la familia JAK (Darnell y otros, 1994).

Por lo tanto, el principal objetivo del presente invento es un péptido antagonista de IL-6, aislable de una librería peptídica a través del sistema de doble híbrido por su capacidad para unir el dominio intracelular de gp130 y que contenía al menos 5 aminoácidos. Según una realización preferida del invento, tales péptidos contenían hasta 30 aminoácidos, más preferiblemente 5-20, más preferiblemente 8-16.

Según el presente invento el “cebo” (“X”) usado en el cribado THS es el dominio intracelular (ICD) de la proteína gp130. Tal dominio corresponde a la región desde el aminoácido en posición 642 hasta el aminoácido en posición 918 (Yamasaki K. y otros, 1988) del IL6-R (gp130). El “pez” en el cribado THS es una librería de péptidos al azar. Tal librería puede ser cualquier librería comercial o puede ser producida “en casa” mediante métodos conocidos.

Los falsos positivos que surgen del anterior cribado pueden ser eliminados como se describen en la bibliografía (Bartel y otros, 1993).

Según una realización preferida adicional, tales péptidos comprenden una secuencia aminoacídica, que es seleccionada del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6, así como sales y derivados funcionales de los mismos.

“Análogos”, como se usa en la presente solicitud, se refiere a los péptidos, en los que uno o más de los aminoácidos en las secuencias anteriores se cambian sin afectar sustancialmente la actividad antagonista de IL-6. En particular cambios preferidos para análogos de acuerdo con el presente invento son los que se conocen como sustituciones “conservadoras”. Las sustituciones aminoacídicas conservadoras incluyen remplazamientos de aminoácidos con aminoácidos sinónimos dentro del mismo grupo, que tienen propiedades fisicoquímicas suficientemente similares de modo que la sustitución entre miembros del grupo conservará la función biológica de la molécula, Grantham, Science, Vol. 185, pp. 862-864 (1974).

Los grupos de aminoácidos sinónimos son los definidos en la Tabla I. Más preferiblemente, los grupos aminoacídicos sinónimos son los definidos en la Tabla II; y más preferiblemente los grupos aminoacídicos sinónimos son los definidos en la Tabla III.

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA I

*Grupos preferidos de aminoácidos sinónimos*

5	<b>Aminoácido</b>	<b>Grupo de sinónimos</b>
	Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
10	Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
	Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
	Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
15	Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
	Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
	Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
20	Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
	Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
25	Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
	Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
	Cys	Ser, Thr, Cys
30	His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
	Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln,
	Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
35	Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
	Asp	Glu, Asn, Asp
40	Glu	As, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

TABLA II

*Más grupos de aminoácidos sinónimos preferidos*

5	<b>Aminoácidos</b>	<b>Grupo de sinónimos</b>
	Ser	Ser
10	Arg	His, Lys, Arg
	Leu	Ile, Phe, Met, Leu
	Pro	Ala, Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Pro, Ala
	Val	Met, Ile, Val
20	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
	Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
25	Tyr	Phe, Tyr
	Cys	Ser, Cys
30	His	Arg, Gln, His
	Gln	Glu, His, Gln
	Asn	Asp, Asn
35	Lys	Arg, Lys
	Asp	Asn, Asp
	Glu	Gln, Glu
40	Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
	Trp	Trp

45

50

55

60

65

TABLA III

*Grupos de aminoácidos sinónimos más preferidos*

5	<b>Aminoácido</b>	<b>Grupo de sinónimos</b>
	Ser	Ser
10	Arg	Arg
	Leu	Ile, Met, Leu
	Pro	Pro
15	Thr	Thr
	Ala	Ala
	Val	Val
20	Gly	Gly
	Ile	Ile, Met, Leu
25	Phe	Phe
	Tyr	Tyr
	Cys	Ser, Cys
30	His	His
	Gln	Gln
	Asn	Asn
35	Lys	Lys
	Asp	Asp
	Glu	Glu
40	Met	Ile, Leu, Met
	Trp	Trp

45 El término “sales” se refiere aquí tanto a las sales de grupos carboxilo como a las sales de adición ácidas de grupos amino de los péptidos del invento o análogos de los mismos. Las sales de un grupo carboxilo puede formarse por medios conocidos en la técnica e incluyen sales inorgánicas, por ejemplo, sales de sodio, calcio, amonio, hierro o zinc, y similares, y las sales con bases orgánicas y las formadas, por ejemplo, con aminas, tales como trietanolamina, arginina o lisina, piperidina, procaina y similares. Las sales ácidas incluyen, por ejemplo, sales con ácidos minerales tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o ácido sulfúrico, y sales con ácidos orgánicos tales como por ejemplo, ácido acético o ácido oxálico. Por supuesto, cualesquiera de tales sales debe tener una actividad sustancialmente similar a la de los péptidos del invento o sus análogos.

55 La definición de “derivados funcionales” como se usa aquí se refiere a los derivados que pueden ser preparados a partir de grupos funcionales presentes en las cadenas laterales de los restos aminoacídicos o sobre los grupos N- o C-terminales según métodos conocidos y están comprendidos en el invento cuando son farmacéuticamente aceptables, es decir, cuando no destruyen la actividad proteica o no transmiten toxicidad a las composiciones farmacéuticas que los contienen. Tales derivados incluyen por ejemplo ésteres o amidas alifáticas de los grupos carboxilo y N-acil derivados de grupos amino libres o derivados O-acilo de grupos hidroxilo libres y están formados con grupos acilo como por ejemplo grupos alcanilo o aroilo.

Los “precursores” son compuestos que son convertidos en péptidos del invento en el cuerpo humano o animal.

65 La “actividad antagonista IL-6” significa capacidad para inhibir la actividad IL-6 antagonizando la unión de IL-6 a su receptor y/o interfiriendo con la función del sistema receptor que transduce, intracelularmente, señales moleculares que llevan a la activación génica en células dependientes de IL-6, tales como, por ejemplo, células de mieloma. Por lo tanto, tal actividad puede ser medida por cualquier de los ensayos conocidos en la técnica. Tales ensayos incluyen la

proliferación de células de plasmacitoma T1165 murino, inhibición del crecimiento de células de leucemia mieloide M1 de ratón, o la producción de proteínas de fase aguda para las células de hematoma.

Los péptidos del invento pueden prepararse mediante cualquier procedimiento bien conocido en la técnica, tal como síntesis en fase sólida o síntesis en fase líquida. Como una síntesis de fase sólida, por ejemplo, el aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido que ha de ser sintetizado es unido a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y mediante repetición alterna de reacciones, una en la que los aminoácidos con sus grupos  $\alpha$ -amino y grupos funcionales de cadenas laterales protegidos con los grupos protectores apropiados son condensado uno a uno en orden desde el extremo C-terminal hasta el extremo N-terminal, y otra en la que los aminoácidos unidos a la resina del grupo protector de los grupos  $\alpha$ -amino de los péptidos son liberados, la cadena peptídica es por tanto extendida de esta manera. Los métodos de síntesis en fase sólida son ampliamente clasificados por el método tBoc y el método Fmoc, dependiendo de el tipo de grupo protector usado.

Grupos protectores típicamente usados incluyen tBoc (t-butoxicarbonilo), Cl-Z (2-clorobenciloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenciloxicarbonilo), Bzl (bencilo), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzhidrilo) Mtr (4-metoxi-2,3,6-trimetilbencenosulfonilo), Trt (tritol), Tos (tosilo), Z (benciloxicarbonilo) y Cl<sub>2</sub>-Bzl (2,6-diclorobencilo) para los grupos amino; NO<sub>2</sub> (nitro) y Pmc (2,2,5,7,8-pentametilcromano-6-sulfonilo) para los grupos guanidinio; y tBu (t-butilo) para los grupos hidroxilo.

Tras la síntesis de los péptidos deseados, se somete a la reacción de desprotección y se corta del soporte sólido. Tal reacción de corte peptídico puede ser llevada a cabo con fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método Boc, y con TFA para el método Fmoc.

El péptido en bruto así obtenido es entonces sometido a purificación. La purificación es llevada a cabo por cualquiera de los métodos conocidos para este propósito, es decir, cualquier procedimiento convencional que implica la extracción, precipitación, cromatografía, electroforesis, o similar. Por ejemplo, HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento) puede ser usada. La elusión puede ser llevada a cabo usando un disolvente basado en agua-acetonitrilo comúnmente empleado para la purificación de proteínas.

Otro objeto del presente invento es, por lo tanto, proporcionar el péptido en forma sustancialmente purificada, para ser adecuado para su uso en composiciones farmacéuticas, como ingredientes activos, en patologías que requieren inhibición de la actividad de IL-6.

Las patologías en las que los nuevos péptidos según el invento son ventajosamente usados para usos profilácticos terapéuticos o diagnóstico incluyendo enfermedades hematológicas, enfermedades del sistema inmune, enfermedades óseas, tumores y enfermedades autoinmunes, así como terapia para trasplantes incluyendo trasplantes de órganos sólidos y trasplantes celulares.

Ejemplos específicos de las categorías anteriores incluyen las siguientes enfermedades: leucemia linfocítica crónica (CLL), plasmacitoma/mieloma múltiple, enfermedad de Castleman (CD), osteoporosis, psoriasis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso, diabetes, artritis reumatoide así como anemia y desechos en enfermedades crónicas.

Objetos adicionales y ventajas del invento serán evidentes en la descripción siguiente.

Una realización del invento es la administración de una cantidad farmacológicamente activa del péptido del invento a sujetos con riesgo de desarrollar patologías que requieren la inhibición de la actividad de IL-6 o a sujetos que ya muestran tales patologías.

Cualquier ruta de administración compatible con el principio activo puede ser usada, pero particularmente preferida es la administración parenteral debido a que permite tener, a corto plazo, efectos sistémicos.

La dosis del péptido a ser administrado depende de la base de la prescripción médica según la edad, peso y la respuesta individual del paciente.

La composición terapéutica para uso parenteral puede ser preparada en forma inyectable que comprende el principio activo y un vehículo adecuado. Los vehículos para la administración parenteral son bien conocidos en la técnica y comprenden, por ejemplo, agua, disolución salina y tampones fisiológicos. Los vehículos pueden contener pequeñas cantidades de excipientes para mantener la estabilidad e isotonicidad de la disolución.

La preparación de las citadas disoluciones pueden ser llevadas a cabo según las modalidades ordinarias.

El presente invento ha sido descrito con referencia a las realizaciones específicas, pero el contenido de la descripción comprende todas las modificaciones y sustituciones que pueden ser llevadas a cabo por una persona con experiencia en la técnica sin extenderse más allá del significado y propósito de las reivindicaciones.

El invento será ahora descrito por medio de los siguientes Ejemplos, que no deberían ser tomados de ningún modo como limitantes del presente invento. Los Ejemplos se referirán a las Figuras especificadas aquí a continuación.

## Descripción de las figuras

Figura 1: Vectores usados en el cribado para péptidos de unión a gp130. El plásmido pASgp130 codifica el dominio de unión a ADN de GAL4 (residuos 1-147 a.a.) fusionado al ICD de gp130; el plásmido, pGADGH codifica una librería de péptidos de 16-mer al azar (NKK)<sub>16</sub> fusionados al dominio de activación GAL4 (residuos 768-881 a.a.).

Figura 2: Transferencia Western de extractos. El CG-1945 (carriles 1 y 2) fue transformado con pAS2-1, que codifica para GAL4BD (carril 3) o con pASgp130, que codifica para GAL4BD gp130 (carril 4). Los extractos de proteínas fueron separados sobre un gel de acrilamida- SDS al 15% y analizados mediante un sistema de detección de quimioluminiscencia. Los pesos moleculares están indicados (kilodaltones). La flecha negra indica gp130-GAL4BD; la flecha gris indica GAL4BD.

Figura 3: Transformación de una librería peptídica. La cepa de levaduras CG-1945 fue transformada con 60 µg de plásmidos de la librería. Las células fueron hechas crecer en medio agar *SD/-Trp/-Leu/His/+ 10mM 3-AT* a 30°C. Después de 4 días, algunas colonias His<sup>+</sup> aparecieron en las placas. En la primera transformación, los autores aislaron 20 clones His<sup>+</sup>; sólo 9 de ellos, enumerados en la figura, fueron también lacZ<sup>+</sup>.

Figura 4: Péptidos. Los péptidos aislados por THS; son agrupados en cinco grupos de homología.

Figura 5: Actividad β-galactosidasa (LacZ) en ensayo líquido. La combinación del clon E y gp130-ICD en células de levadura generaron alrededor de 3 unidades/ml de actividad LacZ. El valor es obtenido a partir de tres experimentos independientes.

Figura 6: Homologías relevantes. El alineado de secuencias de los péptidos E (E<sub>1</sub>) y C con varias tirosinas quinasas asociadas a gp130. Las identidades son indicadas en cursiva; los aminoácidos básicos son marcados como (\*); aminoácidos ácidos son subrayados.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Cribado de una librería peptídica

Una librería de péptidos al azar de 16 mer ha sido cribada con el sistema de doble híbrido (THS). La secuencia codificante del dominio de activación (AD) de GAL4 de levadura fue ligada en marco de lectura a una librería al azar de oligonucleótidos sintéticos que codifican para los péptidos. El vector usado, pGADGH, es un plásmido centromérico que lleva el promotor *ADHI* y el gen *Leu2* de levadura como un marcador de selección (Fig. 1). La librería de péptidos al azar se estima que contiene alrededor de 10<sup>7</sup> clones independientes (véase Materiales y Métodos).

Se realizó RT-PCR en células HepG2, para aislar la porción intracelular de gp130 humano. El cADN correspondiente fue clonado en marco de lectura con la secuencia codificante del dominio de unión (BD) de GAL4 de levadura en el plásmido pAS2-1. Este es un plásmido centromérico que lleva el promotor *ADHI* y el gen *TRP1* de levadura como un marcador de selección.

La expresión de la proteína de fusión ha sido verificada mediante transferencia Western (Fig.2).

En los experimentos realizados por los autores, se usó la cepa de levadura CG-1945, que lleva dos genes reporteros, *lacZ* y *His3* (Estojak y otros, 1995).

Los autores usaron 60 µg de la librería peptídica para cada transformación de las células de levadura recipientes previamente transformadas con el plásmido que codifica la proteína de fusión gp130ic-GAL4BD. Para encontrar el clon que interacciona deseado en la librería AD, los autores cribaron alrededor de 2 x 10<sup>6</sup> clones.

Se llevaron a cabo cinco transformaciones y los resultados de estas transformación son resumidos en la tabla a continuación:

Nº total de clones cribados	1,8 x 10 <sup>6</sup>
Eficacia de transformación (células/µg de ADN)	1 x 10 <sup>4</sup>
Nº total de clones obtenidos con selección solo para His3	250
Nº total de clones obtenidos tras un segundo cribado con lacZ	26



Tras la selección del requerimiento nutricional para histidina (es decir, la selección para interacciones THS con el gen reportero *His3*), un total de 250 clones sobrevivieron de un total de  $1,8 \times 10^6$  clones transformados. Sucesivamente, mediante el cribado para el siguiente gen reportero *lac-Z*, los autores encontraron 26 clones de levadura positivos. (Fig 3).

## Ejemplo 2

### Aislamiento de clones positivos verdaderos

Para eliminar la gran mayoría de falsos positivos residuales, los plásmidos seleccionados por THS que codifican para la librería peptídica han sido retrotransformados en la cepa de cribado original, CG-1945, en las siguientes condiciones: 1) sin ningún plásmido adicional; 2) con un plásmido que codifica el dominio de unión a ADN GAL4 solo (pAS2-1); 3) con el plásmido “cebo” completo o 4) con una proteína de fusión no relacionada (como la lamina-C humana fusionada a GAL4-BD) (Bartel y otros, 1993).

Un clon positivo verdadero produce una señal positiva sólo en la tercera condición listada anteriormente.

Para lograr la tarea anterior, los autores aislaron hasta homogeneidad plásmidos “pez” positivos y los transformaron en *E. coli*. Estos plásmidos AD/librería han sido selectivamente amplificados en *E. coli*, usando su marcador *LEU2* para complementar la mutación *E. coli leuB* de la cepa HB101.

Estos plásmidos han sido usados para retrotransformar la cepa de levadura para eliminar falsos positivos como se describe anteriormente: tras estos procedimientos, se seleccionaron nueve clones positivos (Fig. 4).

Los datos obtenidos a partir del análisis de secuencia indicaron que (i) aunque todos los clones cribados contenían más de un oligonucleótido (NNK)<sub>16</sub>, sólo la primera secuencia oligonucleotídica es expresada como una fusión GAL4 AD/péptido debido al codon stop en marco de lectura en el extremo de cada oligonucleótido; (ii) la mayoría de los péptidos aislados tienen la longitud completa esperada de 16 aminoácidos; (iii) algunos de los péptidos presentaron homologías con proteínas de interacción gp130-ICD conocidas.

Para confirmar la interacción gp130-ICD-péptido, los autores han cambiado los vectores de clonación moviendo el inserto de la librería desde AD al vector ADN-BD y viceversa. Después repitieron el ensayo THS (Van Aelst y otros, 1993).

También realizaron ensayos líquidos de  $\beta$ -galactosidasa para cuantificar la actividad transcripcional: como se muestra en la Figura 5, en presencia de gp130-ICD/GAL4AD el clon de proteína de fusión E/GAL4BD fue capaz de producir una actividad transcripcional de gen *lacZ* alrededor de 2 a 3 veces mayor que en ausencia de gp130-ICD/GAL4AD, confirmando así la interacción detectada después de la primera selección.

### Homologías

Búsquedas en bases de datos proteicas han mostrado ser muy interesantes, porque han revelado homologías entre los péptidos aislados y las proteínas como JAK1 y Tec que están constitutivamente asociadas con el dominio intracitoplasmático de gp130. Aún si estas homologías se limitan a pequeñas extensiones, estos resultados podrían ser útiles para dirigir las futuras investigaciones de estos autores (Fig. 6).

Se seleccionó el clon E en dos transformaciones independientes: este clon muestra una homología con JAK1. Harper y colaboradores han propuesto que las quinasas JAK se dividen en siete dominios designados dominios 1 a 7 de homologías JAK (JH) (Harper y otros, 1992).

JH1 corresponde al dominio tirosina quinasa y JH2 corresponde al dominio serina-treonina quinasa putativo. Los dominios JH3 a JH7 son dominios no catalíticos y no tienen función conocida. El clon E muestra una pequeña región de homología con JAK1: esta homología cae en el dominio JH4.

Harper y colaboradores han sugerido que la asociación de JAK2 con el receptor GH debe ser mediada por los dominios no catalíticos, JH3 a JH7: estos dominios están estructural y funcionalmente conservados en miembros de la familia JAK. JH4 es el más conservado entre estos dominios. Por lo tanto estos datos sugieren que la extensión de JAK1 definida por el péptido E podría jugar un papel funcional: podría mimetizar la unión del sitio JAK1 sobre gp130. También el clon C muestra una homología interesante con Tyk2: esta homología cae en el JH7.

Los otros clones muestran identidades con otras quinasas como LTKR o con proteínas como ANK1, cuyas funciones incluyen la unión de las proteínas integrales de membrana a elementos de citoesqueleto.

### Discusión

Estudios de rutas de señalización de citoquinas sugieren que las señales son generadas mediante interacciones proteína-proteína mediadas por la asociación de dominios proteicos pequeños modulares con secuencias aminoácidas pequeñas específicas. Por ejemplo, dominio 2 de homología a Src (SH2) y dominio 3 de homología a Src (SH3) son

regiones de 60-100 aminoácidos que interactúan con residuos de tirosina fosforilados o regiones ricas en prolina, respectivamente.

Por lo tanto, es concebible que los dominios discretos de las quinasas JAK o de los receptores son requeridos para unión de quinasas JAK y en algunos casos pueden determinar la especificidad de tal unión.

Los datos publicados indican los sitios precisos de gp130-ICD implicados en algunas de estas interacciones: por ejemplo, el dominio box1 de gp130 es un motivo de ocho aminoácidos rico en residuos de prolina. Este dominio debería estar directamente implicado en la interacción con las quinasas JAK, también parece más probable que la secuencia box1 juegue un papel crítico en generar una estructura secundaria que es requerida para la interacción entre las quinasas JAK y los receptores de citoquinas (Murakami y otros, 1991). Otro dominio de gp130 implicado en las interacciones proteína-proteína es la secuencia consenso YXPQ implicada en la activación de STAT3 y STAT1 (Gerhartz y otros, 1996).

Los autores han examinado la asociación de gp130-ICD con una librería de péptidos al azar mediante el THS. Se han identificado nueve clones/péptidos independientes: estos péptidos muestran homologías con proteínas presentes en los bancos de datos. Aún si estas homologías están limitadas a extensiones pequeñas, estos resultados podrían ser útiles para dirigir las futuras investigaciones de estos autores. Si estos datos preliminares son confirmados, se podrían identificar las regiones exactas de las quinasas, tales como JAK1, que se une a gp130-ICD. Estos datos podrían también sugerir que un cribado de péptidos por el sistema de doble híbrido es una técnica adecuada para alcanzar resultados similares.

## Materiales y métodos

### *Construcción de plásmidos que codifican proteínas híbridas*

Todas las construcciones híbridas fueron creadas usando una amplificación por RT-PCR

Las reacciones de PCR contenían 10 µl de cADN de células HepG2, 50 pmoles de cada cebador (véase a continuación), 2,5 unidades de polimerasa Pfu de Stratagene, 0,2 mM de cada uno de los cuatro desoxinucleótidos trifosfatos, 10 µl de tampón Pfu, en un volumen de reacción de 100 µl, cubierto con 50 µl de aceite mineral.

La amplificación fue realizada durante 30 ciclos con un perfil de temperatura de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C y 6 minutos a 72°C.

Todos los fragmentos de PCR fueron digeridos con unas enzimas de restricción apropiadas (EcoRI/BamHI para hgp130) durante toda la noche a 37°C.

Los productos de PCR digeridos fueron purificados mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión y por Microcon 100 (Amicon). Estos fragmentos fueron ligados con el kit de ligación rápida de ADN (Boehringer Mannheim) en ambos vectores pAS2-1 y pGADGH y transformados en células competentes transformadas en Top10F de *E. coli* (Invitrogen).

La librería de péptidos al azar MATCHMAKER (Clontech) consiste en oligonucleótidos (NKK)<sub>16</sub> sintéticos (N= A, G, C o T; K= T o G), flanqueados por sitios *Bam*HI y *Eco*RI y que contienen un codon stop terminal, clonados direccionalmente en el vector pGADGH de alta expresión del dominio de activación (AD) de GAL4. Una mezcla de 16 códones peptídicos al azar fusionados al GAL4AD es generado a partir del vector.

### Cebadores de PCR

**Uppgp130:** 5' CTG GAA TTC ATT AAG CGA GAC CTA ATT AAA AAA CAC ATC  
TGG CCT AAT GTT C3' (SEQ ID NO: 9)

**Logp130:** 5' ACA CGG GAT CCT CAC TGA GGC ATG TAG CCG CCT TGC CGT  
ACA GTC 3' (SEQ ID NO: 10)

El cADN gp130-ICD humano fue amplificado por PCR usando Uppgp 130 y Logp130.

### *Secuenciación de ADN*

La secuenciación de ADN fue realizada en ambas hebras usando el kit de secuenciación de ADN, Dye Primer Cycle Sequencing (Perkin Elmer, Applied Biosystems Division, Foster City, CA, USA) en un secuenciador automatizado modelo ABI 373A, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se realizó una búsqueda de homología frente a las bases de datos GenBank, EMBL y Swiss-Prot.

Cebadores de secuenciación

**Cebador 1 (GAL4 BD):** 5' TCA TCG GAA GAG TAG 3' (SEQ ID NO: 11)

**Cebador 2 (GAL4 AD):** 5' TAC CAC TAC AAT GGA TG 3' (SEQ ID NO: 12)

Cepas de *E. coli* y Medios

**HB101:** *F<sup>-</sup>, hsdS20 (r<sup>-</sup>b, m<sup>-</sup>b), recA13, ara-14, pro A2, lacY1, galK2, rspL20 (Sm<sup>r</sup>), xyl-5, mtl-1, supE44*

**Top10F<sup>+</sup>:** *F<sup>+</sup>, lacI<sup>q</sup>, Tn10, Tet<sup>r</sup>, mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)Φ80 lacZ ΔM15, ΔlacX74 deo R recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL end A1 nupG*

**LB(11):** 10 g Bactotripton  
5 g extracto de levadura  
10 g NaCl

**LB agar (11):** 10 g Bactotripton  
5 g extracto de levadura  
10 g NaCl  
1,5% agar

Extracto de levadura y Medios

La cepa de *Saccharomyces cerevisiae* CG-1945 (*Mat a, ura 3-52, his3-200, lys 2-801, ade 2-101, trp 1-901, leu 2-3, 112, gal4-542, gal 80-538, cyh<sup>r</sup> 2, LYS:: GAL1<sub>UAS</sub>- GAL1<sub>TATA</sub>-HIS3, URA3:: GAL4<sub>17-mer(x3)</sub>-CyC1<sub>TATA</sub>-lacZ*)(Clontech Matchmaker) fueron usados para todos los ensayos. CG-1945 lleva dos genes reporteros bajo el control de diferentes promotores: gen *lacZ* bajo el control del promotor *CYC1*, que tiene su propia secuencia de activación aguas arriba reemplazada con sitios de unión de GAL4, y el gen *His3* bajo el control del promotor *Gall*.

Así, estos promotores comparten poco más que los sitios de unión GAL4 y el cribado realizado con ambos genes reporteros en las mismas levaduras deberían eliminar muchos falsos positivos. Los cultivos de levadura fueron hechos crecer a 30°C tanto en medio YPD (1% de extracto de levadura, peptona 2% y glucosa 2%) o medio mínimo SD (0,5% de base nitrogenada de levadura sin aminoácidos, 2% de glucosas, y 1% de disolución aminoacídica marginal deseada).

Transformación de levadura y ensayo de β-galactosidasa

Los genes de fusión fueron introducidos en la cepa CG-1945 mediante el procedimiento de transformación de acetato de litio (16). Las células fueron repartidas sobre medio agar SD/-Trp-Leu-His+3AT 10 mM para realizar una primera selección. Cuando la interacción tiene lugar entre gp130-ICD y un péptido, los dos dominios funcionales GAL4 se unen, dando lugar a la expresión de histidina. Las células de levadura con proteínas híbridas de interacción pueden así crecer en un medio que le falta este aminoácido.

3-AT (3-amino 1,2,4-triazol), un inhibidor competitivo de la proteína de levadura-*HIS3* (imidazolglicerol-fosfato deshidratasa), es usado para inhibir niveles bajos de His3p que escapan al control de la expresión expresados en algunas cepas reporteras. Los transformantes se dejaron crecer a 30°C, normalmente durante 2-4 días, hasta que las colonias fueron lo suficientemente grandes para ensayar en lo que respecta a la actividad β-galactosidasa.

Los transformantes fueron replicados en filtros Whatman número 1 estériles que habían sido colocados en capas sobre medio de crecimiento selectivo. Después de que las colonias hubieran crecido, se realizaron dos o más ciclos de congelación/descongelación, colocando el filtro en nitrógeno líquido y a temperatura ambiente durante 0,5-1 minutos.

El filtro fue colocado en 5 ml de disolución tampón Z/X-gal en una placa limpia de 100 mm e incubado a 30°C típicamente desde 30 minutos a 8 horas. El filtro fue secado y fotografiado para grabar los datos.

La proteína p53 de ratón y el antígeno T largo de SV40 se conoce que interaccionan en el THS.

## ES 2 273 492 T3

Los siguientes plásmidos, pVA3-1, que codifican el híbrido dominio de unión al ADN de GAL4-p53 murino, y pTD-1, que codifica el híbrido dominio de activación GAL4-antígeno T largo de SV40, fueron usados como testigos positivos en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa.

### 5 Ensayo líquido de $\beta$ -galactosidasa

Se prepararon 5 ml de cultivo durante toda la noche en medio de selección SD líquido apropiado para plásmidos.

Se transfirieron 2 ml de cultivo a 8 ml de YPD y se incubaron a 30°C durante 3-5 horas hasta que las células  
10 estuvieron en la fase media logarítmica ( $D.O_{600} = 0,5-0,8$ ). El cultivo fue centrifugado a 14.000 rpm durante 30 segundos: en la siguiente etapa, se eliminaron los sobrenadantes, se lavaron las células con un volumen de tampón Z y se resuspendieron los precipitados en 900  $\mu$ l de tampón Z.

Inmediatamente, dos o más ciclos de congelación/descongelación fueron realizados, colocando los tubos en nitró-  
15 geno líquido y en una bañera de agua a 37°C durante 0,5-1 minutos. Finalmente, se añadieron 0,7 ml de disolución  $\beta$ -mercaptoetanol-tampón Z y 160  $\mu$ l de ONPG (o-nitrofenil  $\beta$ -galactopiranosido, Sigma) 4 mg/ml disueltos en tampón Z a cada tubo: los tubos fueron incubados a 30°C hasta que se desarrolló un color amarillo.

La reacción fue detenida añadiendo 0,4 ml de  $Na_2CO_3$  1 M: se grabaron los tiempos necesarios para obtener los  
20 resultados y las  $D.O_{420}$  de las mezclas.

Las unidades de  $\beta$ -galactosidasa fueron calculadas mediante esta fórmula:

$$25 \text{ Unidades de } \beta\text{-galactosidasa} = 1.000 \times D.O_{420} / (t \times V \times D.O_{600})$$

En la que t = intervalo de tiempo en minutos de incubación; V = 0,1 ml;  $D.O_{600} = A_{600}$  de 1 ml de cultivo.

### Extractos de proteína de levadura y transferencia Western

Para cada cepa de levadura transformada, se prepararon 5 ml de cultivos a lo largo de toda la noche en medio de  
30 selección SD apropiado para estos plásmidos; también se preparó un cultivo de 10 ml de CG-1945 no transformado en YPD como testigo negativo. Para cada clon que ha de ser ensayado (y el testigo negativo) por separado se transfirieron los cultivos a 50 ml de medio apropiado a lo largo de toda la noche.

Se incubaron los cultivos a 30°C con agitación hasta que la D.O. alcanzó 0,4-0,6: el cultivo fue rápidamente en-  
35 friado añadiéndolo a un tubo de centrifuga de 100 ml preenfriado y centrifugado inmediatamente a 1000 x g durante 5 min a 4°C. Se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron los precipitados celulares en 50 ml de agua enfriada en hielo: el precipitado fue recuperado por centrifugación a 1.000 x g durante 5 min a 4°C. Se resuspendieron los precipitados celulares con tampón Cracking (Urea 8 M, SDS 5%, Tris-HCl 40 mM, EDTA 0,1 mM, azul de bromofenol,  
40 disolución inhibidora de proteasas); se añadieron 80 ml de bolas de vidrio (425-600  $\mu$ m, SIGMA). Las muestras fueron calentadas a 70°C durante 10 minutos y agitadas en vórtex durante 1 minuto. Los restos celulares y células sin romper fueron centrifugados en una microcentrífuga a 14.000 rpm durante 5 minutos. Los sobrenadantes fueron transferidos a tubos nuevos con tapa de rosca de 1,5 ml y hervidos brevemente. Las muestras fueron cargadas inmediatamente sobre un gel o almacenadas a -70°C.

Se realizó una transferencia Western usando extractos de proteína soluble de los transformantes cargando en geles  
45 de acrilamida al 15%. Se hibridaron las membranas con anticuerpos monoclonales específicos para el dominio GAL4, tales como mAbs para GAL4 BD y AD de Clontech. Se usaron para la detección un anticuerpo secundario de cabra anti IgG de ratón conjugado con HRP (BIORAD).

### 50 Referencias

**Bartel, P.L.** y otros (1993) Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques*  
14, 920-924;

**Brakenhoff, J. P.** y otros, (1995) Development of human IL-6 receptor antagonists. *Annals of the New York Aca-*  
55 *demy of Sciences* 762, 129-34;

**Darnell, J.E.** y otros (1994). JAK-STAT pathways and transcripcional activation in response to IFNs and other  
60 extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421;

**Estojak J.** y otros (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with *in vitro* measurements. *Molecular and*  
*Cellular Biology* 15, 5820-5829;

**Fields, S.** y otros, (1994). The two-hybrid systems: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*  
65 10, 286-292;

**Gerhartz, C** y otros, (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp 130 *Journal Biological Chemistry* **271**, 12991-12998;

**Gietz, D.** y otros (1992) Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells *Nucleic Acid Res.* **20**, 1425;

**Harper, A.G** y otros, (1992) JAK, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**, 1347-1353;

**Hirano T.** y otros, (1994) *Stem cells*, **12**, 262-277;

**Kallen, K.J.** y otros, (1997) The therapeutic potencial of interleukin 6 hyperagonists and antagonists. *Exper Opin. Invest. Drugs* **6**, 237-266;

**Lütticken, c.** y otros, (1993) Association of transcription factor APRF and protein kinase JAK1 with the interleukin-6 signal transducer gp 130. *Science* **263**, 89-92;

**Matsuda, T.** y otros, (1995) Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *BLOOD* **85**, 627-633;

**Murakami, N.** y otros, (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor superfamily *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 11349-11353;

**Tanner, J. W.** y otros, (1995) The conserved box1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 6523-6530;

**Van Aelst, L.** y otros, (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6213-6217;

**VanderKuur, J. A.** y otros, (1994) Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase. *Journal Biological Chemistry* **269**, 21709-21717;

**Yamasaki** y otros, *Science*, **241**, 825-828, 1988;

**Yang M** y otros, (1995) Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. *Nucleic Acids Research* **23**, 1152-1156;

**REIVINDICACIONES**

1. Un péptido antagonista de IL-6 que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6, así como sales, derivados funcionales del mismo.

2. El péptido según la reivindicación 1, que contiene hasta 30 aminoácidos.

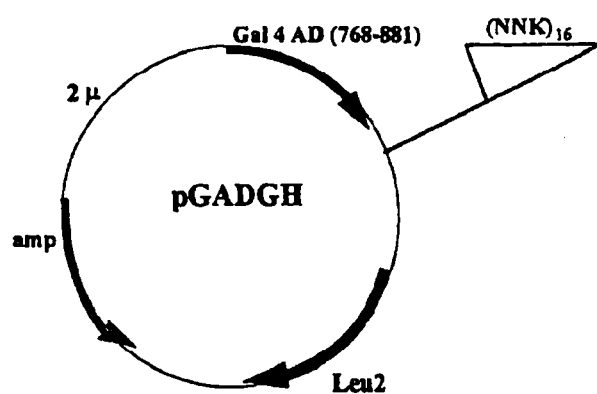
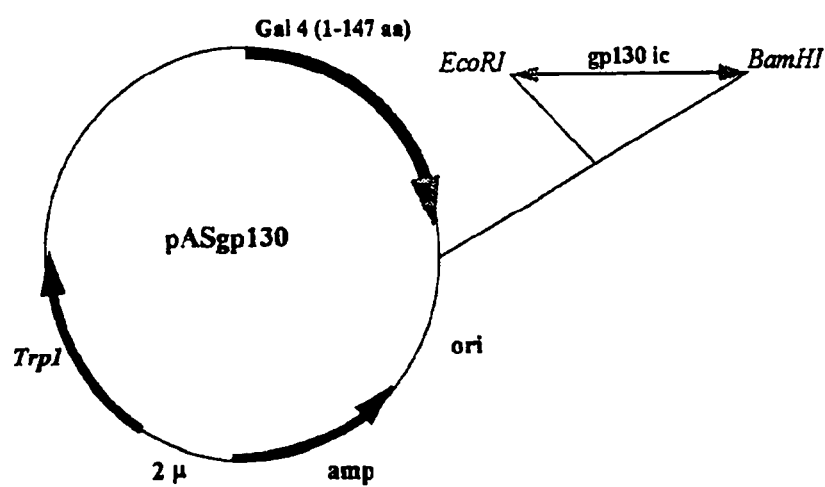
3. El péptido según la reivindicación 1, que consiste en la secuencia aminoacídica SEQ ID NO: 6

4. El péptido según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar como medicamento.

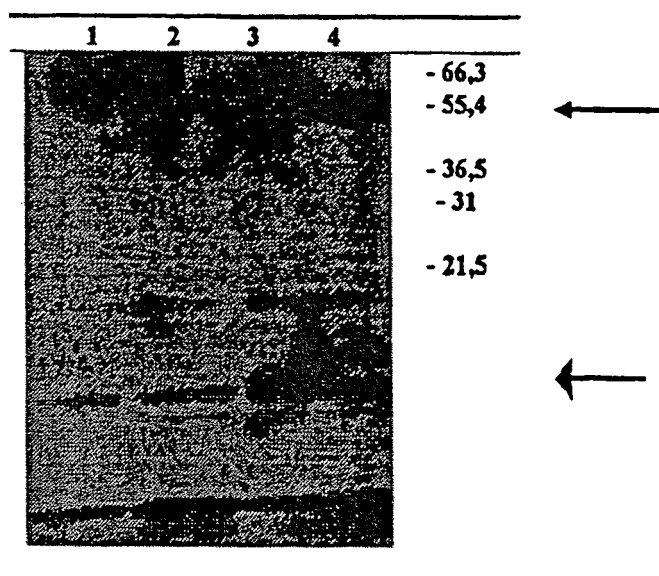
5. El uso de un péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una patología seleccionada entre las enfermedades hematológicas, enfermedades del sistema inmune, enfermedades óseas, tumores y enfermedades autoinmunes, así como terapia para trasplantes incluyendo trasplantes de órganos sólidos y celulares.

6. El uso del péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, para la preparación de composiciones farmacéuticas para el tratamiento de patologías que requieren actividad antagonista de IL-6.

7. Una composición farmacéutica que contiene el péptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 junto con uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticamente aceptables.

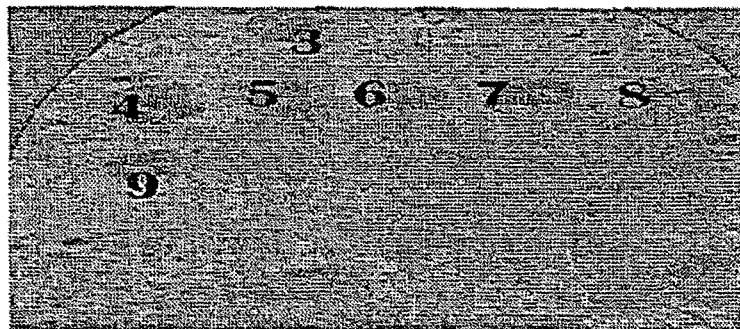
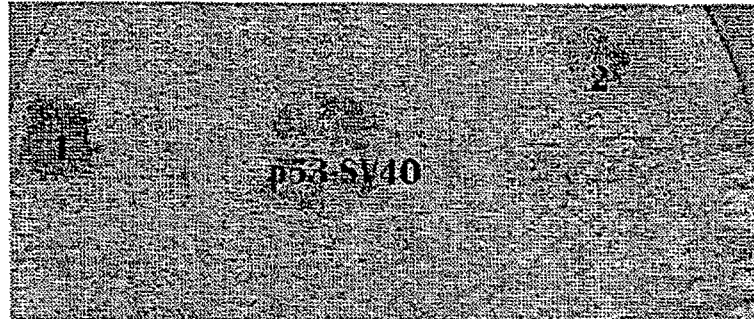


**Figura 1**  
**Vectores usados en el cribado para péptidos de unión a gp130**



**Figura 2**  
**Transferencia Western de extractos de levadura**





**Figura 3**  
**Transformación de la librería peptídica**

**grupo I:**

**Clon A**      T G L S S E V C A G D  
**Gln B**    A G P Y K A M A V Y R F Q R R S  
**Clon C**                  M G G L T R V G

**grupo II:**

**C I O N F E D E R A T I O N H E R E S U P P L Y W G D N E W W R S E P H K M E L**

**grupo III:**

CONFIDENTIAL - A G W K P L A C R W T R S G I A

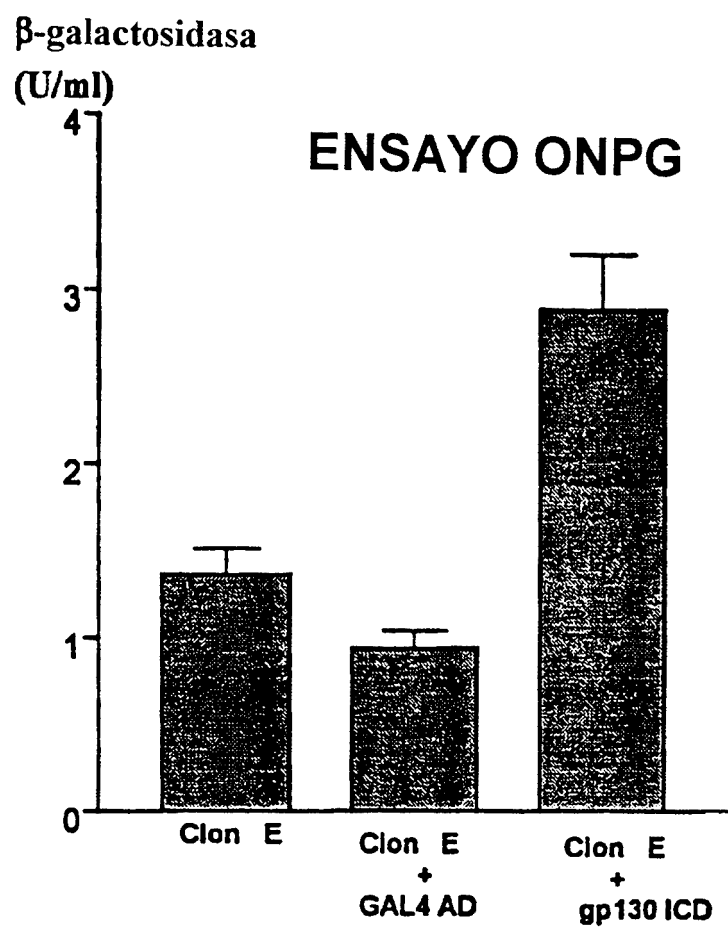
**grupo IV:**

Clon G - N C K A Y E G L V P L E L V S G

**grupo V:**

Clon H R L R

**Figura 4**  
**Péptidos**



**Figura 5**  
**actividad β-galactosidasa en ensayo líquido**

**BTK** E S N L P W W R A R D K N G Q E  
(245-261 z.z.)

**TEC** K N D V H W W R A R D K Y G N E  
(208-274 z.z.)

**ITK** S S E I H W W R V Q D R N G H E  
(212-228 z.z.)

**TYK2** M G G L K V L L L  
(24-32 z.z.)

**Figura 6**

### Homologías relevantes

LISTA DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

- 5 (i) SOLICITANTE
- (A) NOMBRE: APPLIED RESEARCH ARS HOLDING N.V.
- (B) CALLE: 14 JOHN B. GORSIRAWEG
- 10 (C) CIUDAD: CURAÇAO
- (E) PAÍS: LAS ANTILLAS HOLANDESES
- (F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): NINGUNO
- (G) TELÉFONO: 639300
- 15 (H) TELEFAX: 614129

(ii) TÍTULO DEL INVENTO: PÉPTIDOS ANTAGONISTAS DE IL-6

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 12

- 20 (iv) FORMA DE LECTURA POR ORDENADOR:
- (A) TIPO DE MEDIO: disquette
- (B) ORDENADOR: IBM PC compatible
- 25 (C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Versión #1.30 (EPO)

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 1:

- 30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- 35 (C) CATENARIEDAD: sencilla
- (D) TOPOLOGÍA: lineal
- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
- 40 (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (ix) CARACTERÍSTICA:
- 45 (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 3..4
- (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Xaa es seleccionado de entre Gly, Leu y Ser"
- 50 (ix) CARACTERÍSTICA:
- (A) NOMBRE/CLAVE: sitio modificado
- (B) LOCALIZACIÓN: 9..12
- 55 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota= "Xaa, si existe, es seleccionado de entre Gly, Arg, Asp y Ser"
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 1:
- Met Gly Xaa Xaa Thr Arg Val Gly Xaa Xaa Xaa Xaa
- 60 1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 2:

- 65 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:
- (A) LONGITUD: 8 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido

## ES 2 273 492 T3

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 2:

Met Gly Gly Leu Thr Arg Val Gly  
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID No: 3:

Ile Gly Leu Ser Ser Glu Val Gly Arg Gly Asp  
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 4:

Ala Gly Pro Val Lys Ala Met Ala Val Val Arg Val Gly Arg Arg Ser  
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

## ES 2 273 492 T3

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

5 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 5:

Thr	Glu	Ser	Pro	His	Gln	Asn	Asn	His	Arg	Ala	Glu	Thr	Ser	Met
1				5					10					15

10 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 6:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

15 (B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 6:

Trp	Gly	Asp	Asn	Glu	Trp	Trp	Arg	Ser	Glu	Pro	His	Lys	Met	Glu	Leu
1				5					10					15	

30 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

35 (B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

40 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

45 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 7:

Ala	Gly	Trp	Lys	Pro	Leu	Ala	Cys	Arg	Trp	Thr	Arg	Ser	Gly	Ile	Ala
1				5					10					15	

50 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 16 aminoácidos

55 (B) TIPO: aminoácido

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

60 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

65 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 8:

## ES 2 273 492 T3

Asn Cys Lys Ala Val Glu Gly Leu Val Pro Leu Glu Leu Val Ser Gly  
1                      5                      10                      15

5 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 52 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 9:

CTGGAATTCA ATAAGCGAGA CCTAATTAAA AAACACATCT GGCCTAATGT TC

52

25 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 45 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 10:

ACACGGGATC CTCACTGAGG CATGTAGCCG CCTTGCCGTA CAGTC

45

45 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 15 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 11:

TCATCGGAAG AGTAG

15

65 (2) INFORMACIÓN PARA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:



## ES 2 273 492 T3

(A) LONGITUD: 17 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) CATENARIEDAD: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: cADN

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: SEQ ID NO: 12:

TACCACTACA ATGGATG

17