

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 870 914**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/24 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2010 E 17163446 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.04.2021 EP 3311828**

(54) Título: **Péptidos intestinales vasoactivos modificados**

(30) Prioridad:

14.08.2009 US 234151 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

28.10.2021

(73) Titular/es:

PHASEBIO PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
One Great Valley Parkway Suite 30
Malvern, Pennsylvania 19355, US

(72) Inventor/es:

SADEGHI, HOMAYOUN;
TURNER, ANDREW y
DAGHER, SUZANNE

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 870 914 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos intestinales vasoactivos modificados

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a péptidos intestinales vasoactivos (VIPs) y a composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, incluyendo VIPs que tienen una semivida circulatoria prolongada y VIPs que tienen perfiles de unión a receptores que difieren del péptido maduro no modificado.

DESCRIPCIÓN DEL ARCHIVO DE TEXTO ENVIADO ELECTRÓNICAMENTE

10 El contenido del archivo de texto enviado electrónicamente con la presente se incorpora en la presente mediante referencia en su totalidad: Una copia en formato legible por ordenador del Listado de Secuencias (nombre del archivo: PHAS_019_01US_SeqList_ST25.txt, fecha de registro: 4 de agosto de 2010, tamaño del archivo 44 kilobytes).

ANTECEDENTES

15 El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene un número de efectos biológicos incluyendo con respecto a la hemostasia, el sistema inmunitario y el sistema nervioso. Véase Delgado y cols., *The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation*, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004). Por ejemplo, el VIP tiene un efecto beneficioso sobre la presión sanguínea y pulmonar y sobre una amplia gama de condiciones inmunológicas e inflamatorias. El VIP tiene un gran potencial como un agente activo para la hipertensión pulmonar, la neumopatía obstructiva crónica (COPD), la artritis, la enteropatía inflamatoria (IBD) y el asma, por mencionar unas pocas.

20 Existen al menos dos receptores para el VIP, que incluyen VPAC1 y VPAC2. Estos receptores se unen tanto a VIP como a la molécula relacionada polipéptido activador de adenilato ciclase de la pituitaria (PACAP) en algún grado. Ambos receptores son miembros de la familia de receptores acoplados a proteína G 7-transmembranaria. VPAC1 está distribuido, por ejemplo, en el SNC, el hígado, el pulmón, el intestino y los linfocitos T. VPAC2 se encuentra, por ejemplo, en el SNC, el páncreas, el músculo esquelético, el corazón, el riñón, el tejido adiposo, los testículos y el estómago.

25 25 La corta semivida del VIP hace a este péptido poco práctico como un agente farmacéutico. Véase Pozo D y cols., *Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune disorders*. *Peptides* 28(9): 1833-1846 (2007). En efecto, los estudios han mostrado que la semivida de VIP en sangre es menor de 2 minutos (Domschke y cols. 1978, Gut 19; 1049-53; Burhol y cols. 1978, *Scand J Gastroent* 13: 807-813). Además, 30 la multitud de efectos biológicos del VIP puede complicar su desarrollo para cualquier indicación particular. Por lo tanto, son necesarias versiones modificadas de VIP para volver al agente terapéuticamente práctico, por ejemplo, al prolongar la semivida y/o diseñar moléculas que tengan perfiles de unión al receptor deseables.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

35 La presente invención se define mediante las reivindicaciones. La presente divulgación que comprende la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los VIPs modificados para el uso en el tratamiento de una cardiopatía. La divulgación proporciona además métodos para elaborar las moléculas de VIP modificadas y métodos para usar los agentes de VIP modificado para el tratamiento de pacientes. El VIP modificado exhibe una semivida o persistencia circulatoria prolongada en el cuerpo y/o una potencia de unión a receptores y/o biológica comparable y/o un perfil de unión a receptores alterado con respecto al VIP no modificado.

40 40 En un aspecto, la invención proporciona moléculas de VIP modificadas y composiciones farmacéuticas que comprenden las mismas. Las moléculas de VIP modificadas se modifican recombinantemente o químicamente en el extremo N mediante la adición de uno o más aminoácidos y/o mediante fusión a secuencias de aminoácidos heterólogas, a fin de proporcionar una semivida o persistencia circulatoria más prolongada en el cuerpo, una potencia biológica comparable y/o un perfil de unión a receptores modificado. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el VIP maduro de 28 aminoácidos, que empieza con una His N-terminal, comprende aminoácidos N-terminales adicionales, tales como un solo aminoácido en el extremo N (Met). En estas otras realizaciones, el VIP modificado contiene una fusión C-terminal a una proteína similar a elastina (ELP) según se describe en la presente. Estas moléculas de VIP modificadas muestran un incremento de la semivida o persistencia circulatoria en el cuerpo, y una preferencia de unión alterada para VPAC2 sobre VPAC1.

50 Por ejemplo, un VIP se fusiona (p. ej., por medios recombinantes) al extremo N de una ELP. La histidina del VIP maduro natural está en el extremo N. Estos agentes terapéuticos pueden requerir una dosificación significativamente

menos frecuente que el homólogo no fusionado, tal como una dosificación de aproximadamente 1-7 veces por semana (p. ej. una dosificación diaria o semanal).

La fusión VIP-ELP contiene una metionina en el extremo N con la His del producto de VIP maduro natural en la posición 2. En otros casos adicionales, la molécula de VIP-ELP empieza con metionina alanina alanina. Cuando se produce en bacterias, la primera metionina se pierde y el producto contiene Ala-Ala en el extremo N. Ala-Ala se retira *in vitro* o *in vivo* mediante la acción de la peptidasa DPP-IV, dejando de ese modo el extremo N del VIP maduro natural. Estas construcciones que contienen aminoácidos adicionales en el extremo N exhiben una actividad significativamente diferente cuando se prueban con respecto a la actividad de unión en los receptores VPAC1 y VPAC2. Por ejemplo, aunque ambas construcciones pueden activar el receptor VPAC2 con una EC50 similar, una construcción con metionina en el extremo N (e His en la posición 2) es al menos 100 veces menos activa en el receptor VPAC1.

En diversos casos, el VIP modificado de la invención que tiene una Met N-terminal tiene la ventaja de poder obtenerse por medios recombinantes, tales como mediante la producción en *E. coli* u otro sistema de expresión, sin procedimientos de fabricación posteriores a la expresión adicionales para exponer el extremo N del VIP natural o deseado.

En otros casos adicionales, el VIP se puede modificar químicamente, por ejemplo, mediante la adición de uno o más PEG u otros restos químicos (p. ej., en o cerca del extremo N), según se describe con detalle en la presente.

En otros casos, la presente divulgación proporciona polinucleótidos y vectores que codifican el VIP modificado de la invención, así como células hospedadoras que contienen el mismo. Las células hospedadoras pueden ser adecuadas para la producción recombinante del VIP modificado, tales como células bacterianas o de levadura adecuadas para el uso con sistemas de expresión conocidos.

La divulgación proporciona composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento, la mejora o la prevención de una afección en un mamífero. Estas afecciones incluyen una variedad de afecciones cardiovasculares, inmunológicas (p. ej., autoinmunitarias) y neurológicas. Por ejemplo, el VIP modificado se puede usar para ajustar el equilibrio entre efectores proinflamatorios y antiinflamatorios en un paciente, incluyendo un paciente que sufra una enfermedad autoinmunitaria o una afección inflamatoria. Indicaciones ejemplares para el VIP modificado incluyen hipertensión, neumopatía obstructiva crónica (COPD), diabetes, fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, artritis, enteropatía inflamatoria (IBD) y asma, entre otras.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de VIP modificado-ELP (M-VIP-ELP1-120, SEQ ID NO: 14) que tiene Met en el extremo N y 120 unidades de ELP1 (VPGXG, SEQ ID NO: 3) fusionadas al VIP en el extremo C.

La **Figura 2** muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión de VIP modificado-ELP (MAA-VIP-ELP1-120, SEQ ID NO: 15) que tiene Met-Ala-Ala en el extremo N, que es activable hasta el péptido VIP maduro natural, y 120 unidades de ELP1 (VPGXG, SEQ ID NO: 3) fusionadas al VIP en el extremo C.

La **Figura 3** es un mapa plasmídico de pPB1031, que codifica ELP1-120 para la producción conveniente de fusiones recombinantes.

La **Figura 4** representa pPB1046 que codifica una proteína de fusión de M-VIP-ELP1-120 (SEQ ID NOs: 39 y 40). Se muestran los cebadores (P0045, SEQ ID NO: 31, P0048, SEQ ID NO: 32 y P0065, SEQ ID NO: 34) para la construcción del gen recombinante.

La **Figura 5** representa pPB1047 que codifica una proteína de fusión de MAA-VIP-ELP1-120 (SEQ ID NOs: 41 y 42). Se muestran los cebadores (P0066, SEQ ID NO: 35, P0064, SEQ ID NO: 33, P0067, SEQ ID NO: 36) para la construcción del gen recombinante.

La **Figura 6** representa pPB1048 que codifica una proteína de fusión de ELP1-120-VIP (SEQ ID NOs: 43 y 44). Se muestran cebadores para construir el gen recombinante (P0068, SEQ ID NO: 37, P0069, SEQ ID NO: 38).

La **Figura 7** es un análisis en gel NuPAGE en acetato de Tris al 10% de proteínas de fusión de VIP-ELP purificadas, con o sin desnaturización térmica.

La **Figura 8** muestra la actividad *in vitro* de VIP natural y las proteínas de fusión de VIP-ELP PB1046 y PB1047 para el receptor VPAC2.

La **Figura 9** muestra la actividad *in vitro* de VIP natural y la proteínas de fusión de VIP-ELP PB1046 y PB1047 para el receptor VPAC1.

5 La **Figura 10** muestra el efecto *in vivo* de la proteína de fusión de VIP-ELP sobre la presión sanguínea de ratas. El panel de la izquierda muestra la presión sanguínea sistólica. El panel de la derecha muestra la presión sanguínea diastólica. VIP-ELP disminuye la presión sanguínea durante un período de más de 12 horas.

La **Figura 11** es un mapa plasmídico de pPB1120 (SEQ ID NO: 48) que codifica VIP-ELP1-120.

10 La **Figura 12** muestra la actividad *in vitro* de VIP natural y las proteínas de fusión de VIP-ELP PB1120 y PB1046 para el receptor VPAC1.

La **Figura 13** muestra la actividad *in vitro* de VIP natural y las proteínas de fusión de VIP-ELP PB1120 y PB1046 para el receptor VPAC2.

15 La **Figura 14A** muestra el perfil farmacocinético de la proteína de fusión de VIP-ELP PB1120 en monos (n = 3) después de una sola inyección subcutánea de 3 mg/kg con ejes lineales. La **Figura 14B** muestra el perfil farmacocinético de la proteína de fusión de VIP-ELP PB1120 con ejes semilogarítmicos.

Las **Figuras 15A, 15B y 15C** muestran el cambio promedio en la presión arterial sistólica, diastólica y media, respectivamente, a lo largo de intervalos de 3 h en ratas inyectadas subcutáneamente con PB1120 en dosificaciones de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg. La **Figura 15D** muestra la frecuencia cardíaca promedio de las ratas en cuestión a lo largo de intervalos de 3 h después de la administración de PB1120.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

20 La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los VIPs modificados para el uso en el tratamiento de una cardiopatía. Además, la divulgación proporciona métodos para elaborar y usar los agentes de VIP modificados para el tratamiento de pacientes. El VIP modificado exhibe una semivida o persistencia circulatoria prolongada en el cuerpo, una potencia de unión al receptor o biológica comparable y/o un perfil de unión al receptor alterado con respecto a VIP no modificado. En diversos casos, los compuestos de la divulgación exhiben una reducción 25 en la frecuencia de dosificación en comparación con los homólogos no modificados.

Secuencia del péptido intestinal vasoactivo

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es una hormona peptídica que contiene 28 residuos de aminoácido y se produce en muchas zonas del cuerpo humano incluyendo el intestino, el páncreas y los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo en el cerebro. El VIP exhibe una amplia variedad de acciones biológicas incluyendo vasodilatación sistémica, hipotensión, incremento del gasto cardíaco, estimulación respiratoria, hiperglucemia, dilatación coronaria, broncodilatación en animales y seres humanos. El VIP también afecta al equilibrio del sistema inmunitario.

30 El VIP tiene un efecto sobre varias partes del cuerpo. Con respecto al sistema digestivo, el VIP puede inducir la relajación del músculo liso (esfínter esofágico inferior, estómago, vesícula biliar), estimular la secreción de agua en el jugo pancreático y la bilis y provocar la inhibición de la secreción de ácidos gástricos y la absorción desde la luz intestinal. Su papel en el intestino es estimular la secreción de agua y electrolitos, así como dilatar el músculo liso intestinal, dilatar los vasos sanguíneos periféricos, estimular la secreción pancreática de bicarbonato e inhibir la secreción de ácidos gástricos estimulada por gastrina. Estos efectos funcionan conjuntamente para incrementar la movilidad. El VIP tiene la función de estimular la secreción de pepsinógeno por células principales.

35 40 El VIP se ha encontrado en el corazón y tiene efectos significativos sobre el sistema cardiovascular. Provoca vasodilatación coronaria, así como tiene un efecto inotrópico y cronotrópico positivo.

45 50 El VIP es un péptido inmunomodulador útil para tratar la inflamación y una enfermedad autoinmunitaria de tipo TH1 (Véase Delgado y cols., The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, Pharmacol. Reviews 56(2):249-290 (2004)). El VIP es útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (véase la Patente de EE. UU. N° 5.972.883). El VIP y su péptido estructuralmente relacionado polipéptido activador de adenilato ciclase de la pituitaria (PACAP) tienen importantes efectos terapéuticos en una enfermedad reumática inflamatoria crónica, tal como como osteoartritis (OA) y artritis reumatoide (RA), al regular a la baja los componentes tanto inflamatorios como autoinmunitarios de la enfermedad (Juarranz y cols., Vasoactive Intestinal Peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells, Rheumatology, 2004, 43:416-422). Además, el VIP participa en el mantenimiento de la tolerancia inmunitaria al regular el equilibrio entre los efectores proinflamatorios y

antiinflamatorios, o al inducir la emergencia de células T que tienen una actividad supresora contra células T autorreactivas (Pozo y cols., Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune disorders, Peptide, 2007, 28(9):1833-1846).

- 5 El VIP maduro tiene 28 residuos de aminoácido con la siguiente secuencia: HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (SEQ ID NO: 13). El VIP resulta del procesamiento de la molécula precursora de 170 aminoácidos prepro-VIP. Las estructuras de VIP y análogos ejemplares se han descrito en las Patentes de EE. UU. 4.835.252, 4.939.224, 5.141.924, 4.734.400, 4.605.641, 6.080.837, 6.316.593, 5.677.419, 5.972.883, 6.489.297, 7.094.755 y 6.608.174.
- 10 Se detalla en la bibliografía un número de mutaciones para mejorar la estabilidad de péptidos contra proteasas, etc. (véase Onune y cols Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability, Eur. J. Pharm. Biopharm. 2009). Estos péptidos VIP modificados tienen secuencias de SEQ ID NO. 21 (M17L, para evitar la oxidación de Met), SEQ ID NO. 22 (K15R, K20R y K21R, para incrementar la estabilidad proteolítica) y SEQ ID NO. 23 (N24A y S25A, para incrementar la estabilidad proteolítica/térmica). La 15 presente divulgación proporciona péptidos VIP modificados que incluyen una o más de estas modificaciones, y con modificaciones de VIP adicionales descritas en la presente. Moléculas de VIP modificadas ejemplares incluyen los péptidos VIP modificados de SEQ ID NOs. 14-15, 17-27, 40, 42, 44 y 50.
- 20 El VIP modificado comprende SEQ ID NO: 13. Se divultan además análogos funcionales. Generalmente, análogos funcionales de VIP incluyen fragmentos funcionales truncados en el extremo C Nor en de 1 a 10 aminoácidos, incluyendo en 1, 2, 3 o hasta aproximadamente 5 aminoácidos (con respecto a SEQ ID NO: 13). Estos análogos funcionales pueden contener de 1 a 5 inserciones, eliminaciones y/o sustituciones (colectivamente) de aminoácidos con respecto a la secuencia natural (p. ej., SEQ ID NO: 13) y en cada caso retener la actividad del péptido (p. ej., a través de unión a VPAC2 y/o VPAC1). Esta actividad se puede confirmar o ensayar usando cualquier ensayo 25 disponible, incluyendo un ensayo descrito en la presente, e incluyendo cualquier ensayo adecuado para determinar o cuantificar una actividad descrita en Delgado y cols., The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, Pharmacol. Reviews 56(2):249-290 (2004). En estas u otras realizaciones, el componente de VIP del VIP modificado de la invención tiene al menos aproximadamente 50%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% de identidad con la secuencia madura natural (SEQ ID NO: 13). La determinación de la identidad de secuencia entre dos 30 secuencias (p. ej., entre una secuencia natural y un análogo funcional) se puede efectuar usando cualquier herramienta de alineamiento, incluyendo Tatusova y cols., Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, FEMS Microbiol Lett. 174:247-250 (1999).
- 35 La presente invención proporciona una molécula de VIP modificada que tiene preferencia como receptor para VPAC2 o VPAC1, en comparación con VIP no modificado (p. ej., un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:13). Por ejemplo, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa para VPAC2 sobre VPAC1 de al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 500:1 o más. En otras realizaciones, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa para VPAC1 sobre VPAC2 de al menos aproximadamente 40 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, aproximadamente 500:1 o más. Por ejemplo, en ciertos casos, el VIP modificado activa el receptor VPAC2 sustancialmente como el VIP humano maduro no modificado, esto es, con una EC50 dentro de un factor de aproximadamente 2 del VIP humano maduro no modificado (SEQ ID NO:13). Sin embargo, este mismo VIP modificado es 50 o 100 veces más menos eficaz que el VIP humano maduro no modificado en la activación del receptor VPAC1.
- 45 Estas moléculas de VIP modificadas contienen regiones N-terminales modificadas, tales como una adición de 1 a aproximadamente 500 aminoácidos a la histidina N-terminal de VIP, que pueden incluir una secuencia de aminoácidos de mamífero heteróloga. Por ejemplo, el VIP modificado puede contener una sola metionina en el lado N-terminal de la histidina N-terminal natural de VIP maduro. Esta molécula también se prepara convenientemente en *E. coli* u otro 50 sistema de expresión bacteriano, puesto que la metionina no será retirada por *E. coli* cuando el aminoácido adyacente sea histidina. Alternativamente, el aminoácido N-terminal puede ser cualquiera de los aminoácidos presentes en la naturaleza, a saber alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y prolina.
- 55 La secuencia adicional añadida al extremo N de VIP puede ser de cualquier secuencia, incluyendo secuencias biológicamente activas y biológicamente inertes de 1 a aproximadamente 100, de 1 a aproximadamente 50, de 1 a aproximadamente 20, de 1 a aproximadamente 10 y de 1 a aproximadamente 5 aminoácidos.
- 60 El extremo N del VIP modificado puede tener la estructura M-N, donde M es metionina y N es el extremo N de la molécula de VIP (p. ej., SEQ ID No. 14, **FIGURA 1**). Esta metionina apoya la traducción de la proteína en una célula hospedadora bacteriana o eucariótica. Así, el VIP modificado se puede elaborar en un sistema biológico, incluyendo sistemas de expresión bacterianos y de levadura (p. ej., *E. coli*). Aunque a veces la metionina se puede retirar mediante metionina aminopeptidasa (MA) en sistemas de expresión bacterianos, la histidina (H) es uno de los residuos menos favorables en la posición 2 para MA.

En otros casos adicionales, el extremo N se modifica mediante fusión con una proteína heteróloga de mamífero, tal como una proteína de mamífero eficaz para prolongar la semivida de moléculas terapéuticas. Estas secuencias pueden ser secuencias de mamífero, tales como secuencias de albúmina, transferrina o Fc de anticuerpo. Estas secuencias se describen en la Patente de EE. UU. Nº 7.238.667 (particularmente con respecto a conjugados de albúmina), la Patente de EE. UU. Nº 7.176.278 (particularmente con respecto a conjugados de transferrina) y la Patente de EE. UU. Nº 5.766.883.

En otros casos, el VIP es activable por una peptidasa o proteasa, tal como una peptidasa o proteasa endógena. Estas secuencias activables se describen en la Solicitud Internacional Nº PCT/US2009/068656. Según se usan en la presente, los términos "peptidasa" y "proteasa" son intercambiables. Por ejemplo, el VIP se puede diseñar para ser activable por una dipeptidil peptidasa. Dipeptidil peptidasas ejemplares incluyen dipeptidil peptidasa-1 (DPP-I), dipeptidil peptidasa-3 (DPP-III), dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV), dipeptidil peptidasa-6 (DPP-VI), dipeptidil peptidasa-7 (DPP-VII), dipeptidil peptidasa-8 (DPP-VIII), dipeptidil peptidasa-9 (DPP-IX), dipeptidil peptidasa-10 (DPP-X). Se conocen las secuencias de sustratos para estas dipeptidasas.

El extremo N de un VIP activable puede tener la estructura Z-N, donde Z es un sustrato para una dipeptidasa (p. ej., Z se retira mediante exposición a dipeptidasa) y N es el extremo N de VIP. El VIP activable puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-N donde M es metionina, X es Pro, Ala o Ser y N es el extremo N del VIP o análogo de VIP. De este modo, M y X serán sensibles a, y serán retirados por, una célula hospedadora (p. ej., *E. coli*) y/o una dipeptidasa (p. ej., DPP-IV), posteriormente. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es el extremo N de VIP. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (p. ej., DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá N, el extremo N deseado del VIP o el análogo de VIP (p. ej., SEQ ID NO. 15, **FIGURA 2**). En estas realizaciones, la proteína se puede producir mediante la expresión de una construcción que codifica M-X1-X2-N (donde M es metionina) en una célula hospedadora (p. ej., *E. coli*), puesto que Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro en la segunda posición señalarán la retirada de la Met, dejando de ese modo X1-X2 en el extremo N, que se puede activar mediante una dipeptidasa (p. ej., DPP-IV) *in vivo*. Estas moléculas de VIP activables, que se activan para poseer el extremo N de VIP maduro natural, no muestran preferencia por un receptor.

En otro caso, el extremo N del VIP activable modificado puede tener la estructura M-Z-N, donde M es metionina, Z es un sustrato para una dipeptidasa (p. ej., Z se retira mediante exposición a dipeptidasa) y N es un extremo N distinto de His de un VIP activo (VIP modificado). Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-N donde M es metionina; X es Pro, Ala o Ser; y N es un extremo N distinto de His del VIP activo. De este modo, M y X serán sensibles a, y se retiran mediante, una célula hospedadora (p. ej., *E. coli*) y/o una dipeptidasa (p. ej., DPP-IV), posteriormente. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es un extremo N distinto de His del VIP activo. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (p. ej., DPP-IV) y la digestión con dipeptidasa expondrá N, el extremo N distinto de His deseado del VIP.

En otro caso más, el extremo N de un VIP activable modificado puede tener la estructura M-Z-S-N, donde M es metionina; Z es un sustrato para una dipeptidasa (p. ej., Z se retira mediante exposición a dipeptidasa); N es el extremo N de VIP maduro (His); y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con dipeptidasa, y que proporcionan un VIP modificado según se describe previamente. Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-S-N donde M es metionina, X es Pro, Ala o Ser; N es el extremo N-terminal de VIP maduro; y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con dipeptidasa, y proporcionará preferencia para un receptor. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-S-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; N es un extremo N distinto de His de VIP; y S es uno o más aminoácidos que se expondrán después de la digestión con dipeptidasa. X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (p. ej., DPP-IV) y la digestión con dipeptidasa expondrá S.

En estos u otros casos, las modificaciones químicas N-terminales en el extremo N de VIP pueden proporcionar preferencia para un receptor. La modificación química de proteínas y sus métodos son bien conocidos en la técnica. Modificaciones químicas ejemplares no limitativas son PEGilación, metilgioxalación, alquilación reductiva, oxidación con ácido perfrómico, succinilación, aminoetilación y lipidación (Clifton, New Protein Techniques, New Jersey: Humana Press, 1985. ISBN. 0-89603-126-8. Volumen 3 de Methods in Molecular Biology). Los grupos químicos, tales como PEGilación, se pueden ligar mediante modificaciones de cisteína, metionina, histidina, lisina, arginina, triptófano, tirosina, se han descrito previamente grupos carboxilo (véase Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press, 1995).

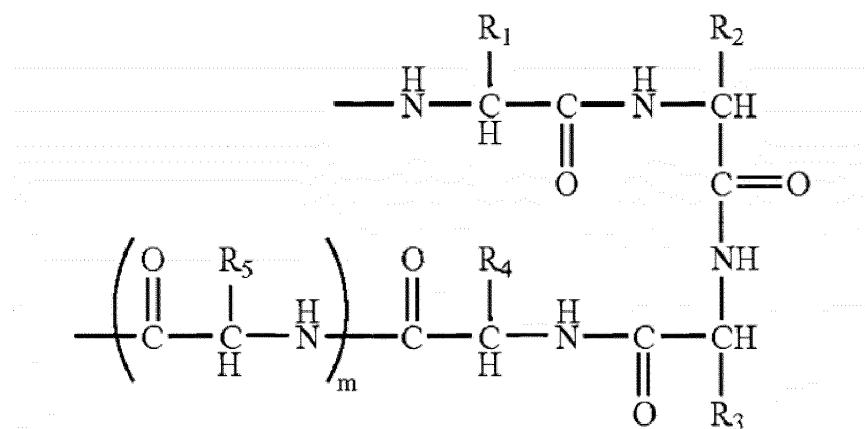
Fusiones a Polímeros Bioelásticos

En algunos casos, el VIP de la invención contiene un componente de polímero bioelástico N-terminal y/o C-terminal. Un "polímero bioelástico" puede exhibir una transición de temperatura inversa. Los polímeros bioelásticos son conocidos y se describen, por ejemplo, en la Pat. EE. UU. Nº 5.520.672 de Urry y cols. Los polímeros bioelásticos

5 pueden ser polipéptidos que comprenden unidades elastómeras de pentapéptidos, tetrapéptidos y/o nanopartículas (p. ej. "péptidos similares a elastina"). Polímeros bioelásticos que se pueden usar para llevar a cabo la presente invención se indican en la Pat. EE. UU. Nº 4.474.851, que describe un número de unidades repetitivas tetrapeptídicas y pentapeptídicas que se pueden usar para formar un polímero bioelástico. Polímeros bioelásticos específicos también se describen en las Pat. EE. UU. Nº 4.132.746, 4.187.852, 4.500.700, 4.589.882 y 4.870.055. Otros ejemplos 10 adicionales de polímeros bioelásticos se indican en la Pat. EE. UU. Nº 6.699.294, la Pat. EE. UU. Nº 6.753.311 y la Pat. EE. UU. Nº 6.063.061.

En un caso, los polímeros bioelásticos son polipéptidos de la fórmula general $(VPGXG)_m$ donde X es cualquier aminoácido (p. ej., Ala, Leu Phe) y m es de aproximadamente 20 a aproximadamente 2000, o de aproximadamente 15 50 a aproximadamente 180. En casos ejemplares, m es 60, 90, 120, 150 o 180. La frecuencia de los diversos aminoácidos como el cuarto aminoácido se puede cambiar, así como la identidad de X.

Por ejemplo, los polímeros bioelásticos pueden comprender unidades elastómeras repetitivas seleccionadas de 20 pentapéptidos y tetrapéptidos bioelásticos, donde las unidades repetitivas comprenden residuos de aminoácido seleccionados del grupo que consiste en residuos de aminoácidos hidrófobos y glicina y donde las unidades repetitivas existen en un conformación que tiene un giro beta de la fórmula:



25 en la que R₁-R₅ representan cadenas laterales de los residuos de aminoácido 1-5, y m es 0 cuando la unidad repetitiva es un tetrapéptido o 1 cuando la unidad repetitiva es un pentapéptido. Las unidades repetitivas nonapeptídicas consisten generalmente en tetra- y pentapéptidos secuenciales. Los residuos de aminoácido hidrófobos se seleccionan de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. En muchos casos, el primer residuo de aminoácido de la unidad repetitiva es un residuo de valina, leucina, isoleucina o fenilalanina; el segundo residuo de 30 aminoácido es un residuo de prolina; el tercer residuo de aminoácido es un residuo de glicina; y el cuarto residuo de aminoácido es glicina o un residuo muy hidrófobo tal como triptófano, fenilalanina o tirosina. Ejemplos particulares incluyen el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly, el tetrapéptido GGVP, el tetrapéptido GGFP, el tetrapéptido GGAP, el pentapéptido es Val-Pro-Gly-Val-Gly, el pentapéptido GVGVP, el pentapéptido GKGVP, el pentapéptido GVGFP, el 35 pentapéptido GFGFP, el pentapéptido GEGVP, el pentapéptido GFGVP y el pentapéptido GVGIP. Véase, p. ej., la Pat. EE. UU. Nº 6.699.294.

En ciertos casos ejemplares, el VIP de la divulgación contiene un componente de ELP N-terminal y/o C-terminal. El componente de ELP comprende o consiste en unidades o secuencias peptídicas estructurales que están relacionadas con, o se derivan de, la proteína elastina. Estas secuencias son útiles para mejorar las propiedades de proteínas terapéuticas en una o más de biodisponibilidad, dosis terapéuticamente eficaz y/o frecuencia de administración, acción biológica, compatibilidad de formulación, resistencia a la proteólisis, solubilidad, semivida u otra medida de la persistencia en el cuerpo después de la administración y/o la velocidad de depuración del cuerpo. Véase, por ejemplo, el documento WO 2008/030968.

45 Cuando la ELP está situada en el extremo C de VIP, se pueden realizar modificaciones adicionales en el extremo N de VIP, tales como la adición de uno o más aminoácidos, según se describe anteriormente. En casos alternativos, no existen estas modificaciones en el extremo N de VIP.

50 El componente de ELP se construye a partir de unidades estructurales de tres a aproximadamente veinte aminoácidos o, en algunos casos, de cuatro a diez aminoácidos, tal como cinco o seis aminoácidos. La longitud de las unidades

estructurales individuales, en un componente de ELP particular, puede variar o puede ser uniforme. En ciertos casos, el componente de ELP está construido por un motivo politetra-, polipenta-, polihexa-, polihepta-, poliocta- y polinonapeptídico de unidades estructurales repetitivas. Unidades estructurales ejemplares incluyen unidades definidas por SEQ ID NOS: 1-12 (véase posteriormente), que se pueden emplear como unidades estructurales repetitivas, incluyendo unidades repetitivas en tandem, o se pueden emplear en alguna combinación, para crear una ELP eficaz para mejorar las propiedades del componente terapéutico. Así, el componente de ELP puede comprender o consistir esencialmente en una unidad o unidades estructurales seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12, según se definen posteriormente.

- 5 10 El componente de ELP, que comprende estas unidades estructurales, puede ser de tamaños variables. Por ejemplo, el componente de ELP puede comprender o consistir esencialmente en de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 unidades estructurales, o en ciertos casos de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 unidades estructurales, o en ciertos casos de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 unidades estructurales, o de aproximadamente 75 a aproximadamente 130 unidades estructurales, incluyendo una o una combinación de unidades definidas por SEQ ID NOS: 1-12. El componente de ELP puede comprender aproximadamente 120 unidades estructurales, tal como repeticiones de las unidades estructurales definidas por SEQ ID NO: 3 (definida posteriormente). Así, el componente de ELP puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 residuos de aminoácido o de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 residuos de aminoácido o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 residuos de aminoácido o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 residuos de aminoácido.
- 15 20

En algunos casos, el componente de ELP, o en algunos casos el agente terapéutico, tiene un tamaño de menos de aproximadamente 150 kDa, o menos de aproximadamente 100 kDa, o menos de aproximadamente 55 kDa, o menos de aproximadamente 50 kDa, o menos de aproximadamente 40 kDa, o menos de aproximadamente 30 o 25 kDa.

- 25 30 35 En algunos casos, el componente de ELP en el estado sin transición puede tener una forma relativamente no estructurada y no globular extendida a fin de escapar a la filtración renal. En estos casos, los agentes terapéuticos de la invención tienen un peso molecular menor que el corte generalmente identificado para la filtración a través del riñón, tal como menor de aproximadamente 60 kD, o en algunos casos menor de aproximadamente 55, 50, 45, 40, 30 o 25 kDa, y sin embargo persistir en el cuerpo al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, o 100 veces más que un homólogo terapéutico no acoplado (p. ej., no fusionado o no conjugado).

40 45 50 55 En estos u otros casos, el componente de ELP no afecta sustancialmente o significativamente a la acción biológica del péptido terapéutico. Así, el VIP con fusión a ELP de la presente invención puede exhibir una potencia (acción biológica) que es igual o similar a su homólogo no fusionado. El VIP con fusión a ELP de la presente invención puede exhibir una potencia o nivel de acción biológica (p. ej., según se prueba *in vitro* o *in vivo*) de 10-100% de la exhibida por el homólogo no fusionado en el mismo ensayo. En diversos casos, el VIP (activado) con fusión a ELP de la presente invención puede exhibir una potencia o nivel de acción biológica (p. ej., según se prueba *in vitro* o *in vivo*) de al menos 50%, 60%, 75%, 80%, 90%, 95% o más del exhibido por el homólogo no fusionado.

60 65 70 75 80 85 90 95 En ciertos casos, el componente de ELP sufre una transición de fase inversa reversible. Esto es, los componentes de ELP están estructuralmente desordenados y son muy solubles en agua por debajo de una temperatura de transición (T_t), pero exhiben una transición de fase de desorden a orden brusca (intervalo de 2-3°C) cuando la temperatura se eleva por encima de la T_t, conduciendo a desolvatación y agregación de los componentes de ELP. Por ejemplo, la ELP forma polímeros insolubles, cuando alcanza un tamaño suficiente, que se pueden retirar y aislar fácilmente de la solución mediante centrifugación. Esta transición de fase es reversible, y las ELPs insolubles aisladas se pueden resolubilizar completamente en solución tamponadora cuando la temperatura vuelve a estar por debajo de la T_t de las ELPs. Así, los agentes terapéuticos de la invención, en algunas realizaciones, se pueden separar de otras proteínas contaminantes hasta una pureza alta usando procedimientos de ciclación de transición inversa, p. ej., utilizando la solubilidad dependiente de la temperatura del agente terapéutico, o adición de sal al medio. Se pueden usar ciclos de transición de fase inversa sucesivos para obtener un alto grado de pureza. Además de la temperatura y la fuerza iónica, otras variables ambientales útiles para modular la transición inversa de los agentes terapéuticos incluyen el pH, la adición de solutos y disolventes inorgánicos y orgánicos, la ionización o la modificación química de cadenas laterales y la presión.

90 95 En ciertos casos, el componente de ELP no sufre una transición de fase inversa reversible, o no sufre esta transición a una T_t biológicamente importante, y así las mejoras en las propiedades biológicas y/o fisiológicas de la molécula (según se describen en cualquier parte en la presente) pueden ser totalmente o sustancialmente independientes de cualesquiera propiedades de transición de fase. No obstante, estas propiedades de transición de fase pueden impartir ventajas prácticas adicionales, por ejemplo, en relación con la recuperación y la purificación de estas moléculas.

95 En la práctica de la presente invención, el componente de ELP funciona para estabilizar o mejorar de otro modo el componente de VIP en la composición terapéutica. Después de la administración de la construcción de VIP-ELP acoplados al paciente que necesite el agente terapéutico de VIP, el componente de VIP y la ELP permanecen acoplados entre sí mientras que el VIP es terapéuticamente activo, p. ej., para el tratamiento o la profilaxis de un estado patológico o afección fisiológica, u otra intervención terapéutica.

En ciertos casos, el componente o los componentes de ELP pueden estar formados por unidades estructurales, incluyendo pero no limitadas a:

- (a) el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly o VPGG (SEQ ID NO: 1);
- 5 (b) el tetrapéptido Ile-Pro-Gly-Gly o IPGG (SEQ ID NO: 2);
- (c) el pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO: 3) o VPGXG, donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (d) el pentapéptido Ala-Val-Gly-Val-Pro o AVGVP (SEQ ID NO: 4);
- 10 (e) el pentapéptido Ile-Pro-Gly-X-Gly o IPGXG (SEQ ID NO: 5), donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (f) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-X-Gly o LPGXG (SEQ ID NO: 7), donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde X varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
- (g) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-Val-Gly o LPGVG (SEQ ID NO: 8);
- 15 (h) el hexapéptido Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly o VAPGVG (SEQ ID NO: 9);
- (i) el octapéptido Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly o GVGVPVG (SEQ ID NO: 10);
- (J) el nonapéptido Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Gly-Ala-Gly o VPGFGVGAG (SEQ ID NO: 11); y
- (K) los nonapéptidos Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Gly o VPGVGVPGG (SEQ ID NO: 12).

20 Estas unidades estructurales definidas por SEQ ID NOS:1-12 pueden formar unidades repetitivas estructurales o se pueden usar en combinación para formar un componente de ELP según la invención. En algunos casos, el componente de ELP está formado enteramente (o casi enteramente) por una o una combinación de (p. ej., 2, 3 o 4) unidades estructurales seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12. En otros casos, al menos 75% o al menos 80% o al menos 90% del componente de ELP está formado por una o una combinación de unidades estructurales seleccionadas de SEQ ID NOS: 1-12, y que pueden estar presentes como unidades repetitivas.

25 En ciertos casos, el componente o los componentes de ELP contienen unidades repetitivas, incluyendo unidades repetitivas en tandem, del pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO:3), donde X es como se define anteriormente, y donde el porcentaje de unidades de pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (SEQ ID NO:3) tomado con respecto a todo el componente de ELP (que puede comprender unidades estructurales distintas de VPGXG (SEQ ID NO:3)) es mayor de aproximadamente 75% o mayor de aproximadamente 85% o mayor de aproximadamente 95% del componente de ELP. El componente de ELP puede contener motivos que tienen una repetición de 5 a 15 unidades (p. ej. una repetición de aproximadamente 10 unidades o aproximadamente 12 unidades) del pentapéptido de SEQ ID NO: 3, con el residuo X invitado variando entre al menos 2 o al menos 3 de las unidades estructurales dentro de cada repetición. Los residuos invitados se pueden seleccionar independientemente, tal como de los aminoácidos V, I, L, A, G y W (y se pueden seleccionar a fin de retener una propiedad de transición de fase inversa deseada). Motivos ejemplares incluyen VPGXG (SEQ ID NO:3), donde los residuos invitados son V (que puede estar presente en de 40% a 60% de las unidades estructurales), G (que puede estar presente en de 20% a 40% de las unidades estructurales y A (que puede estar presente en de 10% a 30% de las unidades estructurales). El propio motivo de repetición puede estar repetido, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 veces, tal como de aproximadamente 8 a 15 veces (p. ej., aproximadamente 12 veces), para crear un componente de ELP ejemplar. Por supuesto, el componente de ELP que se describe en este párrafo puede estar construido a partir de una cualquiera de las unidades estructurales definidas por SEQ ID NOS: 1-12 o una de sus combinaciones. Un componente de ELP ejemplar se muestra en la **Figura 1** fusionado al extremo C de VIP.

40 45 En algunos casos, las unidades de ELP pueden formar una estructura de giro β que proporciona una propiedad similar a elastina (p. ej., transición de fase inversa). Secuencias peptídicas ejemplares adecuadas para crear una estructura de giro β se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US96/05186. Por ejemplo, el cuarto residuo (X) en la secuencia pentapeptídica de elastina, VPGXG (SEQ ID NO:3), se puede alterar sin eliminar la formación de un giro β .

En ciertos casos, los componentes de ELP incluyen repeticiones poliméricas u oligoméricas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO: 3), donde el residuo invitado X es cualquier aminoácido. X puede ser un aminoácido presente en la naturaleza o no presente en la naturaleza. En algunas realizaciones, X se selecciona de alanina, arginina, asparagina,

5 ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En algunas realizaciones, X es un aminoácido natural distinto de prolina o cisteína.

10 El residuo invitado X (p. ej., con respecto a SEQ ID NO: 3 u otra unidad estructural de ELP) puede ser un aminoácido no clásico (no codificado genéticamente). Ejemplos de aminoácidos no clásicos incluyen: isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -aminoisobutírico, ácido A-aminobutírico, Abu, ácido 2-aminobutírico, γ -Abu, ϵ -Ahx, ácido 6-aminohexanoico, Alb, ácido 2-aminoisobutírico, ácido 3-aminopropiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, aminoácidos fluorados, aminoácidos de diseño tales como β -metilaminoácidos, α -metilaminoácidos, α -metilaminoácidos y análogos de aminoácido en general.

15 La selección de X puede ser independiente en cada unidad estructural de ELP (p. ej., para cada unidad estructural definida en la presente que tiene un residuo invitado X). Por ejemplo, X se puede seleccionar independientemente para cada unidad estructural como un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada positivamente, un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada negativamente o un aminoácido que tiene una cadena lateral neutra, incluyendo en algunas realizaciones una cadena lateral hidrófoba.

20 En otros casos adicionales, el componente o los componentes de ELP pueden incluir repeticiones poliméricas u oligoméricas de los pentapéptidos VPGXG (SEQ ID NO:3), IPGXG (SEQ ID NO:5) o LPGXG (SEQ ID NO:7) o una de sus combinaciones, donde X es como se define anteriormente.

25 En cada caso, las unidades estructurales o en algunos casos las repeticiones poliméricas u oligoméricas, de las secuencias de ELP pueden estar separadas por uno o más residuos de aminoácido que no eliminan el efecto global de la molécula, esto es, para impartir ciertas mejoras al componente terapéutico según se describe. En ciertos casos, tales uno o más aminoácidos tampoco eliminan o afectan sustancialmente a las propiedades de transición de fase del componente de ELP (con relación a la supresión de estos uno o más aminoácidos).

30 La estructura de los componentes de ELP resultantes se puede describir usando la notación ELP_k[X_iY_j-n], donde k indica una unidad repetida de ELP particular, las letras mayúsculas entre corchetes son códigos de aminoácido de una sola letra y sus subíndices correspondientes indican la relación relativa de cada residuo invitado X en las unidades estructurales (cuando sea aplicable) y n describe la longitud total de la ELP en número de las repeticiones estructurales. Por ejemplo, ELP1 [V₅A₂G₃-10] indica un componente de ELP que contiene 10 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es valina, alanina y glicina en una relación relativa de 5:2:3; ELP1 [K₁V₂F₁-4] indica un componente de ELP que contiene 4 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es lisina, valina y fenilalanina en una relación relativa de 1:2:1; ELP1 [K₁V₇F₁-9] indica un polipéptido que contiene 9 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es lisina, valina y fenilalanina en una relación relativa de 1:7:1; ELP1 [V₁A₈G₇-10] indica un componente de ELP que contiene 10 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es valina, alanina y glicina en una relación relativa de 1:8:7; ELP1 [V-5] indica un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es exclusivamente valina; ELP1 [V-20] indica un polipéptido que contiene 20 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (SEQ ID NO:3), donde X es exclusivamente valina; ELP2 [5] indica un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido AVGVP (SEQ ID NO:4); ELP3 [V-5] indica un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido IPGXG (SEQ ID NO:5), donde X es exclusivamente valina; ELP4 [V-5] indica un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido LPGXG (SEQ ID NO:7), donde X es exclusivamente valina. Estos componentes de ELP que se describen en este párrafo se pueden usar en relación con la presente invención para incrementar las propiedades terapéuticas del componente terapéutico.

35 Además, la T_t es una función de la hidrofobia del residuo invitado. Así, al variar la identidad del residuo o los residuos invitados y su fracción o fracciones molares, se pueden sintetizar ELPs que exhiban una transición inversa a lo largo de un intervalo de 0-100°C. Así, la T_t a una longitud de ELP dada se puede disminuir al incorporar una fracción mayor de residuos invitados hidrófobos en la secuencia de ELP. Ejemplos de residuos invitados hidrófobos adecuados incluyen valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y metionina. También se puede usar tirosina, que es moderadamente hidrófoba. A la inversa, la T_t se puede incrementar al incorporar residuos, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: ácido glutámico, cisteína, lisina, aspartato, alanina, asparagina, serina, treonina, glicina, arginina y glutamina; preferiblemente seleccionados de alanina, serina, treonina y ácido glutámico.

40 En algunos casos, el componente de ELP se selecciona o diseña para proporcionar una T_t (bajo condiciones fisiológicas) que varía de aproximadamente 10 a aproximadamente 80°C, tal como de aproximadamente 35 a aproximadamente 60°C o de aproximadamente 38 a aproximadamente 45°C. En algunos casos, la T_t es mayor de aproximadamente 40°C o mayor de aproximadamente 42°C o mayor de aproximadamente 45°C o mayor de aproximadamente 50°C. En algunos casos, la temperatura de transición está por encima de la temperatura corporal

del sujeto o paciente (p. ej., >37°C) permaneciendo de ese modo soluble *in vivo* o en otros casos la Tt está por debajo de la temperatura corporal (p. ej., <37°C) para proporcionar ventajas alternativas, tales como la formación *in vivo* de un depósito de fármaco para la liberación sostenida del agente terapéutico. Véase, por ejemplo, el documento US 2007/0009602.

- 5 La Tt del componente de ELP se puede modificar al variar la longitud de cadena de ELP, ya que la Tt generalmente se incrementa con el PM descendente. Para polipéptidos que tienen un peso molecular > 100.000, la escala de hidrofobia desarrollada por Urry y cols. (documento PCT/US96/05186) proporciona un medio para predecir la Tt aproximada de una secuencia de ELP específica. Sin embargo, en algunas realizaciones, la longitud del componente 10 de ELP se puede mantener relativamente pequeña, mientras se mantiene una Tt buscada, al incorporar una fracción mayor de residuos invitados hidrófobos (p. ej., residuos de aminoácido que tienen cadenas laterales hidrófobas) en la secuencia de ELP. Para polipéptidos que tienen un peso molecular <100.000, la Tt se puede predecir o determinar mediante la siguiente función cuadrática: $Tt = M_0 + M_1X + M_2X^2$ donde X es el PM de la proteína de fusión, y $M_0 = 116,21$; $M_1 = -1,7499$; $M_2 = 0,010349$.
- 15 Aunque la Tt del componente de ELP, y por lo tanto del componente de ELP acoplado a un componente terapéutico, está afectada por la identidad y la hidrofobia del residuo invitado, X, también se pueden ver afectadas propiedades adicionales de la molécula. Estas propiedades incluyen, pero no se limitan a, solubilidad, biodisponibilidad, persistencia, semivida, potencia y seguridad de la molécula.
- 20 En la sección de Ejemplos posterior, se observa que el agente de VIP acoplado a ELP retiene una cantidad significativa 25 de la actividad biológica de VIP natural, con relación a formas no fusionadas de VIP. Adicionalmente, se muestra que las ELPs exhiben semividas largas. De forma correspondiente, las ELPs se pueden usar según la invención para incrementar sustancialmente (p. ej. en más de 10%, 20%, 20%, 50%, 100%, 200% o más, en realizaciones específicas) la semivida de VIP, cuando está conjugado con una ELP, en comparación con la semivida de la forma libre (no conjugada) del agente terapéutico. El VIP modificado que tiene una semivida circulatoria prolongada se puede administrar de 1 a aproximadamente 10 veces por semana, tal como de 1 a aproximadamente 5 o de 1 a aproximadamente 30 3 veces por semana. El VIP modificado o la composición farmacéutica que comprende el mismo se puede administrar aproximadamente una vez al día o aproximadamente cada dos días o aproximadamente cada tres días o aproximadamente una vez a la semana (es decir, dosificación una vez por semana).

Conjugación y Acoplamiento

Una proteína de fusión de VIP producida recombinantemente, según ciertos casos de la divulgación, incluye el componente de fusión (p. ej., ELP) y un VIP o un análogo de VIP asociados entre sí mediante fusión genética. Por ejemplo, la proteína de fusión se puede generar mediante la traducción de un polinucleótido que codifica VIP o un análogo de VIP clonado en el marco con el componente de ELP.

En ciertos casos, el componente de ELP y el VIP o un análogo de VIP se pueden fusionar usando un péptido conector de diversas longitudes para proporcionar mayor separación física y permitir más movilidad espacial entre las porciones fusionadas, y así maximizar la accesibilidad de VIP o un análogo de VIP, a modo de ejemplo, para unirse a su receptor cognado. El péptido conector puede consistir en aminoácidos que son flexibles o más rígidos. Por ejemplo, un conector flexible puede incluir aminoácidos que tienen cadenas laterales relativamente pequeñas, y que pueden ser hidrófilos. Sin limitación, el conector flexible puede comprender residuos de glicina y/o serina. Conectores más rígidos pueden contener, por ejemplo, cadenas laterales de aminoácido con más impedimento estérico, tales como (sin limitación) tirosina o histidina. El conector puede tener menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 10 o 5 residuos de aminoácido. 45 El conector puede estar conectado covalentemente a y entre VIP o un análogo de VIP y un componente de ELP, por ejemplo, a través de fusión recombinante.

El conector o espaciador peptídico puede ser escindible con proteasa o no escindible. A modo de ejemplo, espaciadores peptídicos escindibles incluyen, sin limitación, una secuencia peptídica reconocida por proteasas (*in vitro* o *in vivo*) de tipo variable, tales como Tev, trombina, factor Xa, plasmina (proteasas hemáticas), metaloproteasas, catepsinas (p. ej., GFLG, SEQ ID NO: 47, etc.) y proteasas encontradas en otros compartimentos corporales. En algunas realizaciones que emplean conectores escindibles, la proteína de fusión puede ser inactiva, menos activa o menos potente que una fusión, que a continuación se activa tras la escisión del espaciador *in vivo*. Alternativamente, cuando el agente terapéutico es suficientemente activo como una fusión, se puede emplear un espaciador no escindible. El espaciador no escindible puede ser de cualquier tipo adecuado, incluyendo, por ejemplo, restos espaciadores no escindibles que tienen la fórmula $[(\text{Gly})_n\text{-Ser}]_m$, donde n es de 1 a 4, inclusive, y m es de 1 a 4, inclusive. Alternativamente, se podría emplear una secuencia de ELP corta diferente de la ELP del esqueleto en lugar de un conector o espaciador, aunque consiguiendo el efecto necesario.

60 En otros casos adicionales, el agente terapéutico es una fusión recombinante que tiene un componente terapéutico flanqueado en cada extremo por un componente de ELP. Al menos uno de dichos componentes de ELP puede estar ligado a través de un espaciador escindible, de modo que el componente terapéutico sea inactivo, pero se active *in*

vivo mediante la retirada proteolítica de un solo componente de ELP. Siendo activa la fusión de ELP simple resultante y teniendo una semivida (u otra propiedad descrita en la presente) mejorada *in vivo*.

En otros casos, la presente divulgación proporciona conjugados químicos de un VIP o un análogo de VIP y el componente de ELP. Los conjugados se pueden elaborar al acoplar químicamente un componente de ELP a VIP o un análogo de VIP mediante cualquier número de métodos bien conocidos en la técnica (Véase, p. ej., Nilsson y cols., 2005, *Ann Rev Biophys Bio Structure* 34: 91-118). En algunos casos, el conjugado químico se puede formar al conectar covalentemente VIP o un análogo de VIP al componente de ELP, directamente o a través de un resto conector corto o largo, a través de uno o más grupos funcionales en el componente proteínico terapéutico, p. ej., grupos amina, carboxilo, fenilo, tiol o hidroxilo, para formar un conjugado covalente. Se pueden usar diversos conectores convencionales, p. ej., diisocianatos, diisotiocianatos, carbodiimidas, ésteres de bis(hidroxisuccinimida), ésteres de maleimida-hidroxisuccinimida, glutaraldehido y similares.

Los espaciadores químicos no peptídicos pueden ser adicionalmente de cualquier tipo adecuado, incluyendo, por ejemplo, mediante conectores funcionales descritos en *Bioconjugate Techniques*, Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 1995, y los especificados en *the Cross-Linking Reagents Technical Handbook*, disponible de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Illinois). Espaciadores químicos ilustrativos incluyen conectores homobifuncionales que se pueden ligar a grupos amina de Lys, así como conectores heterobifuncionales que se pueden ligar a Cys en un extremo y a Lys en el otro extremo.

En ciertos casos, componentes de ELP relativamente pequeños (p. ej., componentes de ELP de menos de aproximadamente 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa o 10 kDa), que no sufren transición a temperatura ambiente (o la temperatura del cuerpo humano, p. ej., $T_t > 37^\circ\text{C}$), se acoplan o reticulan químicamente. Por ejemplo, dos componentes de ELP relativamente pequeños, que tienen propiedades iguales o diferentes, se pueden acoplar químicamente. Este acoplamiento, en algunos casos, puede tener lugar *in vivo*, mediante la adición de un solo residuo de cisteína en o alrededor del extremo C de la ELP. Estos componentes de ELP se pueden fusionar cada uno a uno o más componentes terapéuticos, a fin de incrementar la actividad o la avidez en la diana.

Polinucleótidos, Vectores, Células hospedadoras y Métodos de Producción

En otro aspecto, la divulgación proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia nucleotídica que codifica el VIP modificado de la invención. Estos polinucleótidos también pueden comprender, además de secuencias que codifican VIP o un análogo de VIP y secuencias de fusión, uno o más elementos de control de la expresión. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender uno o más promotores o mejoradores de la transcripción, sitios de unión ribosómica, señales de terminación de la transcripción y señales de poliadenilación, como elementos de control de la expresión. El polinucleótido se puede insertar dentro de cualquier vector adecuado, que puede estar contenido dentro de cualquier célula hospedadora adecuada para la expresión, tal como *E. coli*.

Generalmente, un vector que comprende el polinucleótido se puede introducir en una célula para la expresión del agente terapéutico. El vector puede permanecer episómico o integrarse cromosómicamente, con la condición de que la inserción que codifica el agente terapéutico se pueda transcribir. Los vectores se pueden construir mediante tecnología de ADN recombinante estándar. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, virus o cualesquiera otros tipos conocidos en la técnica, que se usan para la replicación y la expresión en células procarióticas o eucarióticas. Se apreciará por un experto en la técnica que una amplia variedad de componentes conocidos en la técnica (tales como elementos de control de la expresión) se puede incluir en estos vectores, incluyendo una amplia variedad de señales de transcripción, tales como promotores y otras secuencias que regulan la unión de ARN polimerasa sobre el promotor. Cualquier promotor conocido por ser eficaz en las células en las que se expresará el vector se puede usar para iniciar la expresión del agente terapéutico. Los promotores adecuados pueden ser inducibles o constitutivos.

En ciertos casos, el VIP modificado se expresa a partir de *E. coli* u otro sistema de expresión bacteriano. Generalmente, *E. coli* no retirará la metionina N-terminal durante la expresión, de modo que la molécula de VIP modificada mantiene la especificidad para un receptor. Otros sistemas de expresión se pueden emplear según la invención, incluyendo sistemas de expresión de levadura, sistemas de expresión de mamífero y sistemas baculovirales.

La proteína terapéutica, cuando se emplean secuencias de fusión de ELP, se puede recuperar mediante ciclación de temperatura inversa. Específicamente, según se describe previamente, el componente de ELP sufre una transición de fase inversa reversible. Esto es, los componentes de ELP están estructuralmente desordenados y son muy solubles en agua por debajo de una temperatura de transición (T_t), pero exhiben un transición de fase de desorden a orden brusca (intervalo de 2-3°C) cuando la temperatura se eleva por encima de la T_t , conduciendo a la desolvatación y la agregación de los componentes de ELP. Por ejemplo, la ELP forma polímeros insolubles, cuando alcanzan un tamaño suficiente, que se pueden retirar y aislar fácilmente de la solución mediante centrifugación. Esta transición de fase es reversible, y las ELPs insolubles aisladas se pueden resolubilizar completamente en solución tamponadora cuando la temperatura se devuelve a por debajo de la T_t de las ELPs. Así, los agentes terapéuticos de la invención, en algunas

realizaciones, se pueden separar de otras proteínas contaminantes hasta una alta pureza usando procedimientos de ciclación de transición inversa, p. ej., utilizando la solubilidad dependiente de la temperatura del agente terapéutico o adición de sal al medio. Se pueden usar ciclos de transición de fase inversa sucesivos para obtener un alto grado de pureza. Además de la temperatura y la fuerza iónica, otras variables ambientales útiles para modular la transición inversa de los agentes terapéuticos incluyen el pH, la adición de solutos y disolventes inorgánicos y orgánicos, la ionización o modificación química de cadenas laterales y la presión.

Composiciones farmacéuticas y Métodos de Administración

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad eficaz del VIP modificado de la invención (según se describe anteriormente) junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones farmacéuticas son eficaces para tratar o mejorar, por ejemplo, una enfermedad autoinmunitaria o inflamatoria, según se describe en la presente.

Los agentes terapéuticos de la invención se pueden administrar de por sí así como en diversas formas incluyendo ésteres, sales farmacéuticamente aceptables y otros de sus derivados fisiológicamente funcionales. En estas formulaciones farmacéuticas, los agentes terapéuticos se pueden usar individualmente o junto con (incluyendo formulados con) otros ingredientes terapéuticos, tales como agentes antiinflamatorios o inmunosupresores.

El vehículo o los vehículos deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no excesivamente perjudiciales para su receptor.

Las formulaciones del agente terapéutico incluyen las adecuadas para la administración parenteral así como no parenteral. Modalidades de administración ejemplares incluyen oral, bucal, tópica, nasal, subcutánea, intramuscular e intravenosa, entre otras. Se prefieren las formulaciones adecuadas para la administración oral y parenteral.

Las formulaciones que comprenden el agente terapéutico de la presente invención se pueden presentar convenientemente en formas de dosificación unitaria mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Generalmente, estos métodos incluyen la etapa de asociar los agentes terapéuticos con un vehículo que constituye uno o más ingredientes auxiliares. Típicamente, las formulaciones se preparan al asociar uniformemente e íntimamente el agente terapéutico con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y a continuación, si es necesario, conformar el producto en formas de dosificación de la formulación deseada.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación acuosa estéril del agente terapéutico, que preferiblemente es isotónica con la sangre del receptor (p. ej., solución salina fisiológica). Estas formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes u otros sistemas microparticulados que están diseñados para dirigir el agente terapéutico a la circulación o uno o más órganos. Las formulaciones se pueden presentar en forma de dosis unitaria o múltiples dosis.

Además de los susodichos ingredientes, las formulaciones de esta invención pueden incluir además uno o más ingredientes auxiliares seleccionados de diluyentes, tampones, agentes aromatizantes, desintegrantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (incluyendo antioxidantes) y similares.

Aunque un experto en la técnica puede determinar la dosis deseable en cada caso (incluyendo una dosis unitaria para la administración en depósito), una dosis adecuada del agente terapéutico para alcanzar un beneficio terapéutico puede estar, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 1 microgramo (μg) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por kilogramo de peso corporal del receptor o en un intervalo de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal o en un intervalo de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. La dosis deseada se puede presentar como una dosis o dos o más subdosis administradas a intervalos apropiados a lo largo del período de dosificación (p. ej., una semana, dos semanas, etc....).

Estas subdosis se pueden administrar en formas de dosificación unitaria, por ejemplo, contenido de aproximadamente 10 μg a aproximadamente 500 mg o de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 200 mg o de aproximadamente 50 μg a aproximadamente 100 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Alternativamente, si la condición del receptor así lo requiere, las dosis se pueden administrar como una infusión continua.

Por supuesto, el modo de administración y las formas de dosificación afectarán a la cantidad terapéutica del agente terapéutico activo peptídico que sea deseable y eficaz para una aplicación de tratamiento dada. Por ejemplo, las dosificaciones administradas oralmente pueden ser al menos dos veces, p. ej., 2-10 veces, los niveles de dosificación usados en métodos de administración parenteral. Las formulaciones de depósito también permitirán aportar significativamente más agente terapéutico, de modo que el agente tenga una liberación sostenida a lo largo del tiempo.

El VIP que circula en el plasma de individuos normales se origina a partir de fibras nerviosas que contienen VIP en el tracto gastrointestinal y también refleja el rebosamiento desde nervios vasculares (Cugini y cols., 1991, Reg Pept 34:141-8). Como la mayoría de las proteínas vasoactivas, el VIP tiene una semivida relativamente corta. La semivida

del VIP en sangre es menor de 2 minutos (Domschke y cols., 1978, Gut 19: 1049-53; Burhol y cols., 1978, Scand J Gastroent 13: 807-813). Una ventaja de los CIPs modificados descritos en la presente es la semivida o persistencia prolongada en el cuerpo. Según ciertos casos de la invención, el VIP se puede administrar de 1 a aproximadamente 10 veces por semana, tal como de 1 a aproximadamente 5 o de 1 a aproximadamente 3 veces por semana. El VIP modificado o la composición farmacéutica que comprende el mismo se puede administrar aproximadamente una vez al día o aproximadamente cada dos días o aproximadamente cada tres días o aproximadamente una vez a la semana.

En ciertas realizaciones, el VIP modificado se administra parenteralmente, tal como mediante inyección subcutánea o intramuscular. La administración puede ser una dosis unitaria del VIP modificado según se describe en la presente.

El VIP modificado, cuando se administra parenteralmente, se puede administrar una vez al día o una vez o dos veces a la semana o de una a cinco veces al mes. En estos casos, el VIP modificado se puede administrar como un péptido de fusión soluble, que persiste en la circulación, según se describe en la presente, para proporcionar una actividad sostenida con una administración relativamente infrecuente. El VIP modificado se puede administrar como un depósito de fármaco, según se describe también en la presente, para proporcionar una liberación sostenida de péptido de fusión a la circulación a lo largo del tiempo. Véase el documento US2007/0009602.

Métodos de Uso

La presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento, la mejora o la prevención de una afección en un mamífero. Estas afecciones incluyen una variedad de afecciones cardiovasculares, inmunológicas (p. ej., autoinmunitarias) y neurológicas. Por ejemplo, el VIP modificado se puede usar para ajustar el equilibrio entre efectores proinflamatorios y antiinflamatorios en un paciente, incluyendo un paciente que sufra una enfermedad autoinmunitaria o una afección inflamatoria. Indicaciones ejemplares para el VIP modificado incluyen hipertensión, fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, diabetes, neumopatía obstructiva crónica (COPD), artritis, enteropatía inflamatoria (IBD), enfermedad de Parkinson, traumatismo cerebral y asma, entre otras.

La divulgación proporciona así composiciones farmacéuticas para el uso en el tratamiento de una variedad de afecciones, incluyendo afecciones caracterizadas por autoinmunidad o inflamación. El método comprende administrar una cantidad eficaz del VIP modificado de la invención a un paciente que lo necesite.

Hipertensión

En diversos casos, descritos en la presente, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente que lo necesite, que comprenden administrar una cantidad eficaz del VIP modificado. Formas de hipertensión tratables con los VIPs modificados de la presente invención incluyen hipertensión pulmonar, hipertensión esencial descontrolada e hipertensión resistente.

La hipertensión pulmonar es una enfermedad relativamente rara pero muy letal caracterizada por hipertensión arterial pulmonar progresiva y un incremento del engrosamiento de arterias y arteriolas pulmonares menores, culminando en insuficiencia ventricular derecha (RV) (Said y cols. 2007, Circulation 115: 1260-8). El VIP se ha relacionado con la circulación pulmonar y sistémica. Con respecto al lecho vascular pulmonar y sus alteraciones en la hipertensión pulmonar, el VIP relaja el músculo liso vascular pulmonar de varias especies de mamíferos *in vitro*, neutraliza o atenúa las acciones de la endotelina y otros vasoconstrictores, reduce la vasoconstricción pulmonar hipoxica e inhibe la proliferación de músculo liso vascular pulmonar de pacientes con hipertensión pulmonar. Por otra parte, el VIP es un cotransmisor del sistema fisiológico no adrenérgico no colinérgico de relajación del músculo liso vascular pulmonar. Por otra parte, se ha presentado que los nervios que contienen VIP, normalmente abundantes en la arteria pulmonar, están ausentes en arterias pulmonares de pacientes con hipertensión pulmonar, y la inhalación del péptido tenía un efecto terapéutico beneficioso sobre esos pacientes (Petkov y cols., 2003, J. Clin Invest. 111: 1339-1346). Finalmente, los estudios han mostrado que la terapia de restitución de VIP en ratones VIP^{-/-} es capaz de prevenir o al menos frenar la progresión de cambios patológicos clave en la hipertensión pulmonar (Said y cols., 2007, Circulation 115: 1260-8). Así, se puede esperar que la aplicación de VIP a pacientes con hipertensión pulmonar dé como resultado una mejora sustancial de los parámetros hemodinámicos y de pronóstico de la enfermedad (Petkov y cols., 2003, J. Clin Invest. 111: 1339-1346).

La hipertensión esencial descontrolada es una presión sanguínea que es invariablemente superior a la normal cuando no se puede encontrar causa para la presión sanguínea elevada. La hipertensión esencial es el tipo de hipertensión más prevalente, afectando a 90-95% de los pacientes hipertensos (Carretero y cols., 2000, Circulation 101: 329-35) y los expertos creen que está provocada por varios factores sin descubrir. Las concentraciones de VIP se disminuyen en ratas con hipertensión esencial propensas a apoplejía (Mori y cols., 1993, Jpn Heart J. 34: 785-94) y el uso de VIP humano con liposomas estéricamente estabilizados puede normalizar la presión arterial sistémica en hámsteres espontáneamente hipertensos (Onyuksel y cols., 2006, Peptides 27: 2271-5).

La hipertensión resistente es una forma de presión sanguínea elevada que no responde a tratamiento (es decir, la presión sanguínea permanece elevada aunque se administre una combinación de fármacos). Las causas de un control escaso de la presión sanguínea son numerosas. Las causas más probables son la sobrecarga de volumen debida a exceso de toma de sodio, a intolerancia a los medicamentos, a falta de cumplimiento terapéutico y a hipertensión secundaria (Graves JW, 2000, Mayo Clin Prac 75: 278-84). Como un potente vasodilatador sistémico, el VIP tiene utilidad para el tratamiento y la prevención de la hipertensión en pacientes que presenten los rasgos característicos de la hipertensión resistente.

Cardiopatía

En realizaciones adicionales, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir una cardiopatía en un paciente que lo necesite, que comprenden administrar una cantidad eficaz del VIP modificado. Formas de cardiopatía tratables con los VIPs modificados de la presente invención incluyen fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía.

Los cambios en la síntesis y la secreción de VIP en el corazón parecen representar un papel en la patogénesis de varias enfermedades, tales como insuficiencia cardíaca y fibrosis miocárdica (Dvoráková MC, 2005, Drug News Perspect. 18: 387-91). A modo de ejemplo, la concentración de VIP se disminuye significativamente tanto en tejido de pacientes con cardiomiopatía como en tejido cardíaco procedente de modelos de insuficiencia cardíaca en animales (Unverferth y cols., 1986, J. Lab Clin Med 108: 11-16). Por otra parte, la degradación de VIP se incrementa en corazones con fibrosis y por consiguiente la concentración de VIP miocárdica disminuye. Así, la disminución de VIP parece ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad (Ye y cols., 2003, Acta Physiol Scand 179: 353-60) y las concentraciones reducidas de VIP se asocian con un empeoramiento progresivo de la insuficiencia cardíaca. El uso del inhibidor de vasopeptidasa omapatrilat, que se sabe que disminuye la velocidad de depuración metabólica de VIP, daba como resultado una disminución en la presión sanguínea sistólica así como una disminución en la fibrosis miocárdica en comparación con un control (Ye y cols., 2004, Eur J Pharmacol 485: 235-42). También se presentaba un efecto protector de VIP en miocardio isquémico y reperfundido (Kalfin y cols., 1994, J Pharmacol Exp Ther 268: 952-8). Por lo tanto, se puede esperar que la aplicación de las modificaciones de VIP de la presente invención tenga un efecto beneficioso en una variedad de afecciones patológicas, incluyendo insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía y fibrosis miocárdica.

Preferencia por el Receptor VPAC2

En algunas realizaciones, tales como cuando el VIP modificado tiene una preferencia superior para VPAC2 en comparación con VIP no modificado, el VIP modificado puede reducir respuestas inflamatorias, tales como respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, en un paciente. En algunas de estas realizaciones, el VIP modificado reduce el desarrollo de células T autorreactivas. En estas realizaciones, el paciente puede tener una o más afecciones definidas por inflamación de tipo TH1 o autoinmunidad TH1, tales como artritis (incluyendo RA), enteropatía inflamatoria (p. ej., enfermedad de Crohn), diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, síndrome de Sjogren, pancreatitis, uveorretinitis, queratitis y choque séptico.

COPD es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, que afecta a tanto como 8% de los individuos en las naciones industrializadas. Existe un incremento en el número de mujeres y hombres que sufren COPD. La hipertensión pulmonar es un síntoma común de la obstrucción crónica del flujo de aire, pero los mecanismos precisos del incremento de la resistencia vascular no están claros. Causas potenciales de hipertensión pulmonar en la COPD incluyen la destrucción enfisematosa del lecho capilar, la remodelación de los vasos pulmonares y la vasoconstricción pulmonar hipoxica.

El VIP es una de las moléculas más abundantes encontradas en el tracto respiratorio. Debido a sus propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras, se ha propuesto como un nuevo tratamiento para la COPD y el asma. Aunque la regulación al alza de VPAC1 es dominante, tanto VPAC1 como VPAC2 son necesarios para una señalización antiinflamatoria óptima (Burian y cols., 2010, Peptides 31: 603-8). Según esto, se puede esperar que el tratamiento con VIP y formas modificadas de VIP, tales como los péptidos de fusión divulgados en la presente, ayude a disminuir la inflamación crónica en el pulmón de pacientes con COPD y asma.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos que no se deben considerar limitativos.

EJEMPLOS

55 Ejemplo 1

Clonación de construcciones de VIP-ELP

La secuencia de ADN para el péptido VIP era como se describe en Simoncsits y cols. (Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of artificial genes coding for biologically active elongated precursors of the vasoactive intestinal polypeptide, Eur. J. Biochem. 1988, 178(2):343-350), excepto que el residuo 17 era la metionina natural y no tenía ninguna de las extensiones C-terminales descritas (Véase SEQ ID NO. 16).

- 5 Se elaboraron dos variantes iniciales, una con una metionina en el extremo N, debido al codón de inicio ATG requerido, (PB1046, SEQ ID NO. 17) y una con el tripéptido MAA en el extremo N (PB1047, SEQ ID 18). La metionina en PB1046 normalmente sería retirada por metionina aminopeptidasa (MA) pero como la histidina es el segundo residuo y uno de los aminoácidos menos favorecidos en esta posición para MA, la metionina no se retira. La metionina en PB1047 se retiraba para dejar AA, que a continuación se puede retirar *in vitro* o *in vivo* por DPPIV para dar la histidina como el residuo N-terminal. La secuencia de ADN de VIP se clonó en el vector pPB1031 (véase la **Figura 3**) que soporta la secuencia de ADN de ELP1-120 para dar un casete de expresión bajo el control del promotor T7.
- 10 15 Los oligonucleótidos sintéticos P0045 (SEQ ID NO. 31), P0048 (SEQ ID NO. 32), P0064 (SEQ ID NO. 33) y P0065 (SEQ ID NO. 34) se renaturalizaron conjuntamente, se digirieron con la enzima de restricción XbaI y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción XbaI/KpnI para dar el plásmido de expresión pPB1046 (véase la **Figura 4**).
- 20 25 Los oligonucleótidos sintéticos P0066 (SEQ ID NO. 35), P0064 (SEQ ID NO. 33), P0067 (SEQ ID NO. 36) y P0065 (SEQ ID NO. 34) se renaturalizaron conjuntamente, se digirieron con la enzima de restricción XbaI y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción XbaI/KpnI para dar el plásmido de expresión pPB1047 (véase la **Figura 5**).
- 30 Además, y suponiendo que el extremo N no era un requisito absoluto para la actividad, también se elaboró una fusión C-terminal, pPB1048 (véase la **Figura 6**). Los oligonucleótidos sintéticos P0068 (SEQ ID NO. 37) y P0069 (SEQ ID NO. 38) se renaturalizaron conjuntamente y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción BglII/NheI para dar el plásmido de expresión pPB1048.

Ejemplo 2

Expresión de Construcciones de VIP-ELP

- 30 La cepa de producción de *E.coli* BLR (Novogen) se transformó con los plásmidos pB1046, pPB1047 y pPB1048 y se hizo crecer en medio enriquecido en matraces agitados a 37°C durante la noche. Las pellas celulares se resuspendieron en tampón de TE pH 8,0, se sometieron a lisis a través de un microfluidizador (Microfluidics), se centrifugaron para retirar el material insoluble y el producto se purificó del lisado soluble resultante al 'someter a transición' (ref) con la adición de NaCl hasta 3 M. Las muestras se recogieron a través de dos rondas adicionales de transición para dar las muestras purificadas finales. Estas se analizaron mediante SDS-PAGE y se encontró que PB1046 y PB1047 daban dos bandas (véase la **Figura 7**). Suponiendo que esto fuera como resultado de la proteólisis, los cultivos se hicieron crecer de nuevo, pero esta vez, antes de la lisis, se calentaron hasta 60°C durante 15 minutos. El análisis mediante gel NuPAGE en acetato de Tris al 10% indicaba que se había inhibido la proteólisis (véase la **Figura 7**).
- 40 45 La proteólisis se producía, lo más probablemente, dentro del péptido y probablemente cerca de la unión del péptido y la ELP ya que no se observaba rotura en la fusión C-terminal PB1048. Esta proteólisis se podía prevenir mediante desnaturalización térmica de la proteasa o las proteasas antes de la lisis de las células, que podría tender a implicar a una proteasa o proteasas periplásmicas en lugar de una proteasa citosólica o una proteasa citosólica que se activara o se comporta de un modo diferente tras la lisis.

Ejemplo 3

Actividad de la fusión de VIP Modificado-ELP *in vitro*

- 50 Para medir la actividad biológica y la potencia *in vitro* de VIP o proteínas de fusión de VIP-ELP, se usaba un bioensayo celular. El ensayo mide el incremento en la concentración de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) intracelular en respuesta al tratamiento con VIP o proteínas de fusión de VIP-ELP en células de ovario de hámster chino (CHO) que se han manipulado para expresar bien el receptor de péptido intestinal vasoactivo humano 2 (VPAC2) o bien el receptor de péptido intestinal vasoactivo humano 1 (VPAC1). Tanto VIP como las proteínas de fusión de VIP-ELP pueden estimular la producción de cAMP en estas células, indicando que las proteínas de fusión retienen la capacidad de unirse a y activar el receptor. Puesto que la cantidad de acumulación de cAMP en células después de la unión y activación del ligando mediada por receptor es directamente proporcional a la cantidad de péptido o proteína de fusión intactos presentes, el ensayo se puede usar para determinar la bioactividad y la potencia relativa.

En este ejemplo, se probó la actividad de las proteínas de fusión de VIP-ELP PB1046 y PB1047. La construcción pPB1046 contiene VIP con una Met en el extremo N y la construcción pPB1047 contiene VIP con Ala-Ala en su extremo N. Ambas construcciones tienen ELP(1-120) en su extremo C. En el primer experimento, se probó la actividad de las construcciones usando una célula CHO que expresa el receptor de VIP (VPAC2). Después de una incubación de 30

5 minutos de diversas concentraciones de las proteínas de fusión con la célula, las células se sometieron a lisis y la cantidad de cAMP producida se midió usando un estuche comercial. PB1047 se trataba con DPP-IV antes de la adición a las células. La **Figura 8** muestra el resultado. Según se muestra, la proteína de fusión de VIP modificada PB1046 es algo más activa que la proteína de VIP natural, mientras que PB1047 es menos activa.

10 La actividad de pPB1046 y pPB1047 también se probó usando una célula CHO que expresa receptor de VIP (VPAC1). Después de una incubación de 30 minutos de diversas concentraciones de las proteínas de fusión con la célula CHO, las células se sometieron a lisis y la cantidad de cAMP producida se midió usando un estuche comercial. PB1047 se trató con DPP-IV antes de la adición a las células. La **Figura 9** muestra el resultado. Esta vez, la proteína de fusión de VIP modificada PB1046 es mucho menos activa que la proteína de VIP natural, mientras que la actividad relativa de PB1047 contra VIP natural es aproximadamente la misma que en la prueba para el receptor VPAC2. Estos resultados sugieren que PB1046 activa selectivamente el receptor VPAC2 sobre el receptor VPAC1.

15

Ejemplo 4

Efecto en la presión sanguínea de la proteína de fusión de VIP-ELP

20 La actividad de la proteína de fusión de VIP modificado-ELP PB1047 también se probó *in vivo*. Específicamente, se probaron los efectos de la proteína de fusión de VIP-ELP sobre la presión sanguínea. Ratas espontáneamente hipertensas se trataron subcutáneamente con PB1047 (10 mg/kg) o control de tampón y sus presiones sanguíneas se midieron en varios puntos después de la administración de la proteína de fusión. Se usaron cinco animales para cada grupo y las gráficas muestran el promedio y la desviación estándar. PB1047 reducía significativamente la presión sanguínea sistólica y diastólica en estos animales durante al menos 12 horas después de la administración (véase la **Figura 10**), indicando que la proteína de fusión VIP-ELP es activa, y se puede usar potencialmente como productos farmacéuticos para tratar enfermedades relacionadas con VIP.

25

Ejemplo 5

Proteínas de fusión de VIP-ELP adicionales

30 El tratamiento con DPP IV de PB1047 daba como resultado la retirada tanto de AA como de HS del extremo N y la inactivación del péptido. Por lo tanto, se construyó el plásmido pPB1064, donde el extremo N se cambiaba por MAAHG, SEQ ID NO: 45, en lugar de MAAHS, SEQ ID NO: 46, debido a que HG es más resistente a DPP IV que HS.

También se construyó el plásmido pPB1056, que codifica un VIP con un conector cargado opuestamente (SEQ ID NO. 20) basándose en la repetición VPGXG, SEQ ID NO: 3, antes de la ELP.

35 **Ejemplo 6**

Clonación, Expresión y Análisis de una Proteína de Fusión de VIP-ELP Adicional, PB1120

La secuencia de ADN de VIP se clonó en el vector pPB1120 (SEQ ID NO: 48) (véase la **Figura 11**) que soporta la secuencia de ADN de ELP1-120 para dar un casete de expresión bajo el control del promotor T7. Posteriormente, la cepa de producción de *E. coli* BLR se transformó con el plásmido pPB1120 y se hizo crecer en medio enriquecido 40 según se describe anteriormente. Las muestras del péptido de fusión de VIP-ELP1-120 resultante, PB1120, se purificaron y se analizaron a través de SDS-PAGE.

45 La actividad del péptido de fusión PB1120 se probó *in vitro*. La actividad se probó usando un ensayo que utilizaba células CHO que expresan receptor de VIP (VPAC1) según se describe anteriormente en el Ejemplo 3. Como demuestra la **Figura 12**, PB1120 era aproximadamente 1,4 veces menos activo que el péptido VIP natural sobre el receptor VPAC1. En comparación, la construcción PB1046 que contiene un residuo de metionina N-terminal era aproximadamente 11 veces menos activa que el péptido VIP natural. A lo largo del curso de múltiples experimentos, PB1120 era en todas partes de 1,4 a 6 veces menos activo que el péptido VIP natural sobre el receptor VPAC1.

50 La **Figura 13** ilustra la actividad de PB1120 para el receptor VPAC2. Como los resultados observados para el receptor VPAC1, PB1120 muestra ligeramente menos actividad (~1,5 veces menor) que el péptido VIP natural para VPAC2. Sin embargo, en contraste con los resultados observados con VPAC1, PB1046 era equipotente para VPAC2 en comparación con el péptido natural. A lo largo del curso de múltiples experimentos, PB1120 era en todas partes de 1,5 a 7 menos activo que el péptido VIP natural sobre el receptor VPAC2.

Ejemplo 7

Perfil Farmacocinético de la Proteína de Fusión de VIP Modificado-ELP PB1120

Además de los ensayos de potencia biológica descritos anteriormente, también se examinó el perfil farmacocinético de la proteína de fusión de VIP-ELP PB1120. Se les administraron a monos inyecciones subcutáneas (SC) individuales (dosificadas en 3 mg/kg) de PB1120 y las concentraciones de fármaco en plasma se midieron diariamente a lo largo del transcurso de una semana. Se usaron tres animales y las gráficas muestran el promedio y la desviación estándar. Más de la mitad de la dosis inicial de PB1120 permanecía en la circulación el día 4 (véanse las **Figuras 14A** y **14B**, que ilustran las concentraciones plasmáticas medias de PB1120 después de la administración SC usando ejes lineales y semilogarítmicos, respectivamente).

Basándose en estos datos, parece haber una fase de absorción prolongada después de la administración subcutánea de PB1120, de acuerdo con la absorción lenta desde la zona de administración. La semivida ($t_{1/2}$) de eliminación aparente, basándose en la reducción de las concentraciones plasmáticas, variaba de 9,9 a 45,8 h y probablemente refleja la absorción lenta más que la verdadera eliminación. Estos datos indican que la proteína de fusión de VIP-ELP tiene una semivida drásticamente prolongada en comparación con VIP natural y se puede administrar potencialmente a intervalos prolongados (p. ej., se puede administrar aproximadamente una vez al día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tres días o aproximadamente una vez a la semana).

Ejemplo 8

Efectos de la Proteína de Fusión de VIP Modificado-ELP PB1120 sobre la Presión Sanguínea

Para medir los efectos de la proteína de fusión de VIP modificado-ELP PB1120 sobre la presión sanguínea arterial sistólica, diastólica y media, se administraron a ratas inyecciones subcutáneas individuales de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg de PB1120 y se evaluaron a lo largo de intervalos de 3 h. Las **Figuras 15A, 15B** y **15C** muestran el cambio promedio en la presión arterial sistólica, diastólica y media, respectivamente. La **Figura 15D** muestra la frecuencia cardíaca promedio a lo largo de intervalos de 3 h después de la administración de PB1120. Como demuestran las **Figuras 15A-C**, las ratas inyectadas bien con 1 mg/kg o bien con 5 mg/kg de PB1120 mostraban reducciones significativas en la presión arterial sistólica, diastólica y media 9 h después de la inyección, indicando que la proteína de fusión de VIP-ELP PB1120 se puede administrar potencialmente con el propósito de tratar o prevenir la hipertensión en individuos afectados.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos en la presente tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto normal en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque se pueden usar en la práctica o las pruebas de la presente invención cualesquiera métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente, se describen en la presente los métodos y materiales preferidos.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> PhaseBio Pharmaceuticals, Inc.
- <120> Péptidos Intestinales Vasoactivos Modificados
- <130> PHAS-019/D01EP
- <140> Divisionaria del documento EP10808864.2
- 40 <150> Documento US 61/234.151
- <151> 2009-08-14
- <160> 50
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1

< 211> 4

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

5 < 223> Tetrapéptido de ELP

<400> 1

Val Pro Gly Gly

1

<210> 2

< 211> 4

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Tetrapéptido de ELP

<400> 2

Ile Pro Gly Gly

15 1

<210> 3

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20 <220>

< 223> Pentapéptido de ELP

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (4)..(4)

25 < 223> Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde Xaa varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 3

Val Pro Gly Xaa Gly

1 5

<210> 4

< 211> 5

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Pentapéptido de ELP

<400> 4

Ala Val Gly Val Pro
1 5

10 <210> 5

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> Pentapéptido de ELP

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (4)..(4)

20 < 223> Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde Xaa varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 5

Ile Pro Gly Xaa Gly
1 5

<210> 6

< 211> 5

25 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Pentapéptido de ELP

<400> 6

Ile Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 7

< 211> 5

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Pentapéptido de ELP

<220>

10 < 221> misc_feature

< 222> (4)..(4)

< 223> Xaa puede ser cualquier residuo de aminoácido natural o artificial, y donde Xaa varía opcionalmente entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 7

Leu Pro Gly Xaa Gly
1 5

<210> 8

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

20 <220>

< 223> Pentapéptido de ELP

<400> 8

Leu Pro Gly Val Gly
1 5

<210> 9

25 < 211> 6

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> ELP hexapéptido
<400> 9
Val Ala Pro Gly Val Gly
1 5
<210> 10
5 < 211> 8
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Octapéptido de ELP
10 <400> 10
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
1 5
<210> 11
< 211> 9
< 212> PRT
15 < 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> Nonapéptido de ELP
<400> 11
Val Pro Gly Phe Gly Val Gly Ala Gly
20 1 5
<210> 12
< 211> 9
< 212> PRT
< 213> Secuencia Artificial
25 <220>
< 223> Nonapéptido de ELP
<400> 12

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
 1 5

<210> 13

< 211> 28

< 212> PRT

5 < 213> Homo sapiens

<400> 13

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25

<210> 14

< 211> 634

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> M-VIP ELP1-120

<400> 14

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
 1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly
 20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
 35 40 45

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
 50 55 60

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val
 65 70 75 80

15 Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro

ES 2 870 914 T3

85

90

95

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
100 105 110

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
115 120 125

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
130 135 140

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
145 150 155 160

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
165 170 175

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
180 185 190

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
195 200 205

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
210 215 220

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
225 230 235 240

Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
245 250 255

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly
260 265 270

Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
275 280 285

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
290 295 300

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val
305 310 315 320

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
325 330 335

ES 2 870 914 T3

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
340 345 350

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
355 360 365

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly
370 375 380

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
385 390 395 400

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
405 410 415

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly
420 425 430

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
435 440 445

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
450 455 460

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Gly Val
465 470 475 480

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro
485 490 495

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
500 505 510

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
515 520 525

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
530 535 540

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
545 550 555 560

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
565 570 575

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
580 585 590

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
595 600 605

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
610 615 620

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630

ES 2 870 914 T3

<210> 15

< 211> 636

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

5

<220>

< 223> MAA-VIP ELP1-120

<400> 15

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val
20 25 30

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
35 40 45

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
50 55 60

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
65 70 75 80

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
85 90 95

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
100 105 110

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
115 120 125

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
130 135 140

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
145 150 155 160

ES 2 870 914 T3

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
165 170 175

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
180 185 190

Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
195 200 205

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
210 215 220

Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
225 230 235 240

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly
245 250 255

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
260 265 270

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
275 280 285

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
290 295 300

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
305 310 315 320

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly
325 330 335

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
340 345 350

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
355 360 365

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
370 375 380

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
385 390 395 400

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
405 410 415

ES 2 870 914 T3

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
 420 425 430

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
 435 440 445

Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 450 455 460

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
 465 470 475 480

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly
 485 490 495

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 500 505 510

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
 515 520 525

Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
 530 535 540

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
 545 550 555 560

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
 565 570 575

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
 580 585 590

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
 595 600 605

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
 610 615 620

Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
 625 630 635

<210> 16

< 211> 93

< 212> ADN

5

< 213> Homo sapiens

<400> 16

atggcgcccc actctgacgc tgtttcact gacaactaca ctcgtctgcg taaacagatg 60
 gctgttaaaa agtacacctgaa ctctatcctg aac 93

<210> 17

< 211> 29

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

5 <220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1046

<400> 17

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 18

10 < 211> 31

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1047

15 <400> 18

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25 30

<210> 19

< 211> 31

< 212> PRT

20 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1064

<400> 19

Met Ala Ala His Gly Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25 30

<210> 20

< 211> 51

< 212> PRT

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1056

<400> 20

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
 1 5 10 15

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val
 20 25 30

Pro Gly Glu Gly Val Pro Gly Asp Gly Val Pro Gly Glu Gly Val Pro
 35 40 45

Gly Asp Gly
 50

10 <210> 21

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

15 < 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 21

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
 1 5 10 15

Leu Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
 20 25

<210> 22

< 211> 28

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

5 <400> 22

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Arg Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 23

< 211> 28

< 212> PRT

10 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 23

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn
20 25

15 <210> 24

< 211> 31

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 24

Met	Ala	Ala	His	Xaa	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu
1															15

Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn
20														30

<210> 25

< 211> 31

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>

10 < 221> MISC_FEATURE

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 25

Met	Ala	Ala	His	Xaa	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu
1															15

Arg	Lys	Gln	Leu	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Ala	Ala	Ile	Leu	Asn
20														30

15 <210> 26

< 211> 31

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

20 < 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>

< 221> MISC_FEATURE

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa puede ser Ser o Gly

ES 2 870 914 T3

<400> 26

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
1 5 10 15

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25 30

<210> 27

< 211> 31

5 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>

10 < 221> MISC_FEATURE

< 222> (5)..(5)

< 223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 27

Met Ala Ala His Xaa Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu
1 5 10 15

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Ile Leu Asn
20 25 30

15 <210> 28

< 211> 27

< 212> PRT

< 213> DESCONOCIDA

<220>

20 < 223> PACAP-27 : PROTEÍNA NATURAL

<400> 28

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 29

ES 2 870 914 T3

< 211> 38

< 212> PRT

< 213> DESCONOCIDA

<220>

5 < 223> PACAP-38 : PROTEÍNA NATURAL

<400> 29

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 30

< 211> 41

10 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> PACAP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 30

Met Ala Ala His Gly Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr
1 5 10 15

Arg Arg Gln Leu Ala Val Arg Arg Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Val
20 25 30

Pro Gly Glu Gly Val Pro Gly Asp Gly
35 40

15

<210> 31

< 211> 60

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

20

<220>

< 223> P0045 : CEBADOR

ES 2 870 914 T3

<400> 31

aattctctag aaataaattt gtttaactt aagaaggaga tatacatatg cactctgacg 60

<210> 32

< 211> 76

5 < 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> P0048 : CEBADOR

<400> 32

gtagttgtca gtgaaaacag cgtcagagtg catatgtata tctccttctt aaagttaaac 60

10 aaaattattt ctagag 76

<210> 33

< 211> 78

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

15 <220>

< 223> P0064: CEBADOR

<400> 33

ctgtttcac tgacaactac actcgtctgc gtaaacagat ggctgttaaa aagtacctga 60

actctatcct gaacgtac 78

<210> 34

20 < 211> 54

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> P0065 : CEBADOR

25 <400> 34

gttcaggata gagttcaggt acttttaac agccatctgt ttacgcagac gagt 54

<210> 35

ES 2 870 914 T3

< 211> 60
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
5 < 223> P0066 : CEBADOR
<400> 35
ctagaataa tttgttaa cttaagaag gagatataca tatggcgcc cactctgacg 60
<210> 36
< 211> 76
10 < 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
<220>
< 223> P0067 : CEBADOR
<400> 36
gtagttgtca gtgaaaacag cgtcagagtg ggccgccata tgtatatctc cttcttaaag 60
15 ttaaacaaaa ttattt 76
<210> 37
< 211> 97
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial
20 <220>
< 223> P0068 : CEBADOR
<400> 37
tggccgact ctgacgctgt tttcaactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct 60
gttaaaaagt acctgaactc tatcctgaac tgataag 97
<210> 38
25 < 211> 104
< 212> ADN
< 213> Secuencia Artificial

ES 2 870 914 T3

<220>

< 223> P0069 : CEBADOR

<400> 38

ctagcttatac agttcaggat agagttcagg tacttttaa cagccatctg tttacgcaga 60
cgagtgttagt tgtcagtgaa aacagcgtca gagtgccggcc agcc 104

5 <210> 39

< 211> 240

< 212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

10 < 223> Secuencia de fusión de mVIP-ELP 1-120 pPB1046

<400> 39

taatacgaact cactataggg gaatttgtgag cggtataacaa ttcccctcta gaaataattt 60
tgtttaactt taagaaggag atatacatat gcactctgac gctgtttca ctgacaacta 120
cactcgtctg cgtaaacaga tggctgttaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc 180
gggcgtgggt gttccgggccc tgggtgttcc ggggtggcggt gtgccggcgc caggtgttcc 240

<210> 40

< 211> 50

15 < 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de fusión de mVIP-ELP 1-120

<400> 40

Met His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys
1 5 10 15

Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn Val Pro Gly
20 25 30

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala
35 40 45

20

Gly Val
 50

<210> 41
 < 211> 240
 < 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Secuencia de fusión de mVIP-ELP 1-120 pPB1047

<400> 41

taatacga cactataggg gaattgtgag cgataacaa ttcccctcta gaaataattt tgtttaac tt taagaaggag atatacatat ggcggccac tctgacgctg ttttca caactacact cgtctgcgt aacagatggc tttaaaaag tacctgaact ctatc cgtaccgggc gtgggtgttc cggcgtggg tttccgggt ggcggtgtgc cggcgcagg	60 120 180 240
---	-------------------------

10 <210> 42
 < 211> 49
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia Artificial
 <220>
 < 223> Secuencia de fusión de mVIP-ELP 1-120

15 <400> 42

Met Ala Ala His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu 1 5 10 15	
---	--

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Val Pro 20 25 30	
--	--

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly 35 40 45	
--	--

Ala
 <210> 43
 < 211> 180

20 < 212> ADN
 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Secuencia de fusión de ELP 1-120-VIP pPB1048

<400> 43

tggccgggt gcaggcggtc cgggtggcggtgtgcccggc tggccgcact ctgacgctgt 60

tttcaactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct gttaaaaagt acctgaactc 120

5 tattcctgaac tgataagcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgga tccgaattcg 180

<210> 44

< 211> 44

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10 <220>

< 223> Secuencia de fusión de ELP 1-120-VIP

<400> 44

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
1 5 10 15His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
20 25 30Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
35 40

<210> 45

15 < 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Extremo N de VIP modificado

20 <400> 45

Met Ala Ala His Gly
1 5

<210> 46

< 211> 5

< 212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> Extremo N de VIP modificado

<400> 46

Met Ala Ala His Ser
1 5

5

<210> 47

<211> 4

<212> PRT

< 213> Secuencia Artificial

10

<220>

< 223> Secuencia espaciadora peptídica

<400> 47

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 48

15

<211> 8135

<212> ADN

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> pPB1120

20

<400> 48

ES 2 870 914 T3

taatacgact cactataggg gaatttgtag cgataacaa ttcccctcta gaaataattt	60
tgttaacct taagaaggag atatacatat ggagaacctg tatttccaac actctgacgc	120
tgtttcact gacaactaca ctcgtctgcg taaacagatg gctgttaaaa agtacctgaa	180
ctctatcctg aacgtaccgg gcgtgggtgt tccggcgtg ggtgtccgg gtggcgggt	240
gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggt	300
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt	360
tccggcgtg ggtgttccgg gtggcgggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	420
gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	480
tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt tccggcgtg ggtgtccgg gtggcgggtgt	540
gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt	600
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt	660
tccggcgtg ggtgttccgg gtggcgggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	720
gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	780
tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt tccggcgtg ggtgtccgg gtggcgggtgt	840
gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt	900
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt	960
tccggcgtg ggtgttccgg gtggcgggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1020
gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	1080
tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt tccggcgtg ggtgtccgg gtggcgggtgt	1140
gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt	1200
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt	1260
tccggcgtg ggtgttccgg gtggcgggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt	1320
gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgtccgg gtgcaggcgt	1380
tccgggtggc ggtgtccgg gcgtgggtgt tccggcgtg ggtgtccgg gtggcgggtgt	1440
gccgggcgca ggtgttcctg gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtccgg gtgttgggtgt	1500

accagggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 1560
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcga ggtgttccgt gtgttaggtgt 1620
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1680
tccgggtggc ggtgtgccgg gactgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt 1740
gccgggcga ggtgttccgt gtgttaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttgggtgt 1800
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 1860
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcga ggtgttccgt gtgttaggtgt 1920
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttgggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1980
tccgggtggc ggtgtgccgg gatggccgtg ataagctagc atgactgggt gacagcaaat 2040
gggtcggatc cgaattcggag ctccgtcgag caccaccacc accaccacca ccactaattg 2100
attaataacct aggctgctaa acaaagcccc aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc 2160
ttagcaataa ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gtttttgct 2220
gaaaggagga actatatccg gattggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcatthaagc 2280
gcggcgggtg tgggtggcac ggcagcgtg accgctacac ttgcccgcgc cctagcgc 2340
gctcccttcg ctttcttccc ttcccttctc gccacgttcg ccggcttcc cctgtcaagct 2400
ctaaatcggg ggctccctt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaa 2460
aaacttgatt agggtgatgg ttacgttagt gggccatcgc cctgatagac gtttttcgc 2520
cccttgcacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tgttccaaac tggaaacaaca 2580
ctcaacccta tctcggtcta ttctttgtat ttataaggga ttgtcccgat ttccggctat 2640
tggtaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga atttaacaa aatattaacg 2700
tttacaattt caggtggcac ttccggggaa aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt 2760
ttctaaatac attcaaataat gtatccgctc atgaattaat tcttagaaaa actcatcgag 2820
catcaaatac aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt ttgtaaaaag 2880
ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg 2940
gtatcggtct gcgattccga ctctgtccaaat atcaatacaa ccttataatt tccctcgtc 3000
aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg 3060
caaaagtta tgcatttctt tccagacttg ttcaacagggc cagccattac gtcgtcatc 3120
aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat tgcgcctgag cgagacgaaa 3180
tacgcgtatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa 3240
caactgcccggc gcatcaacca tattttcacc tgaatcagga tattttcttatacctggaa 3300
tgcgttttc ccggggatcg cagtggtgag taaccatgca tcatcaggag tacggataaa 3360

atgcttgatg gtcggaaagag gcataaaattc cgtcagccag tttagtctga ccatctcatc	3420
tgtAACATCA ttggcaacgc taccttgcc atgtttcaga aacaactctg ggcgcattt	3480
cttcccatac aatcgataga ttgtcgacc tgattgccg acattatcgc gagcccat	3540
atacccat aatcagcat ccatgttgg aatataatcgc ggcctagagc aagacgtt	3600
ccgttgaata tggctcataa cacccttgc attactgtt atgttaagcagc acagttt	3660
tgttcatgac caaaatccct taacgtgagt ttgcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag	3720
aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa	3780
caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgcgg a tcaagagcta ccaactctt	3840
ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaa tactgtcctt ctatgttagc	3900
cgtatgttcc accaccacttc aagaactctg tagcaccggc tacatacctc gctctgtaa	3960
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa	4020
gacgatagtt accggataag ggcgcggcgtt cgggctgaac ggggggttcg tgacacacgc	4080
ccagcttgg a gcaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa	4140
gcccacgct tccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggttaagcggc agggcggaa	4200
caggagagcg cacgagggag ctggcggg gaaacgcctg gtatcttata agtccgtcg	4260
ggtttgcctt cctctgactt gagcgtcgat ttttgcgtat ctgcgtcagg gggcggagcc	4320
tatggaaaaa cgccagcaac gggccttt tacgggtcct ggcctttgc tggccttttgc	4380
ctcacatgtt ctttcctgct ttatcccctg attctgtgaa taaccgtatt accgcctttg	4440
agttagctga taccgcctgc cgacggccaa cgaccgagcg cagcgtca gtgagcggagg	4500
aagcggaaaga ggcctgtat cggtatccc tccttacgca tctgtgcgg atttcacacc	4560
gcataatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgtatgcc gcatagttaa gccagtatac	4620
actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcggcc gacaccggcc aacaccggct	4680
gacgcgcctt gacgggcttg tctgtcccg gcatccgcctt acagacaagc tgtgaccgtc	4740
tccggagat gcatgtgtca gaggtttca ccgtcataac cgaaacgcgc gaggcagctg	4800
cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgc	4860
tccagctcgt tgagttctc cagaagcgtt aatgtctgca ttctgataaa gcggccat	4920
ttaagggcgg tttttccctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc	4980
atggggtaa tgataccgt gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgtatgt	5040
gaacatgccc ggttactgga acgttgcgag ggttaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg	5100
gaccagagaa aatcactca gggtaatgc cagcgttgc ttaatacaga tgttaggttt	5160
ccacagggtt gccagcagca tcctgcgtat cagatccgaa acataatggt gcaggcgcct	5220
gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tggtgttgc	5280

caggtcgtag acgtttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgctat cggtgattca	5340
ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg	5400
atcatgctag tcatgccccg cgcccacccgg aaggagctga ctgggttcaa ggctctcaag	5460
ggcatcggtc gagatcccg gtcctaatga gtgagctaac ttacattaat tgcgttgcgc	5520
tcactgcccgg cttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcgccaa	5580
cgccggggga gaggcggtt gcttattggg cgccagggtg gttttcttt tcaccagtga	5640
gacggcaac agctgattgc cttcacccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc	5700
cacgctgggtt tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggtaacg gcggatata	5760
acatgagctg tttcggtat cgtcgatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag	5820
cccgactcg gtaatggcgc gcattgcgc cagcgccatc tgatcggtt caaccagcat	5880
cgcagtggga acgatccct cattcagcat ttgcattgtt tggtaaac acggacatggc	5940
actccagtcg cttcccggtt ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatattatg	6000
ccagccagcc agacgcagac ggcggagac agaacttaat gggccgcta acagcgcgt	6060
ttgctggta cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcttaccgt cttcatggg	6120
gaaaataata ctgttgatgg gtgtctggc agagacatca agaaataacg ccggacatt	6180
agtgcaggca gcttccacag caatggcatc ctggcatcc agcggatagt taatgatcag	6240
cccaactgacg cggtgcgcga gaagattgtg cacccggctt ttacaggctt cgaccccgt	6300
tcgttctacc atcgacacca ccacgtggc acccaggta tcggcgcgag attaatcgc	6360
cgccacaatt tgccgacggcg cgtgcaggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa	6420
cgactgttg cccggcgtt gttgtccac gcggttgggaa atgtaattca gctccgcatt	6480
cgccgcttcc acttttccc gcttttcgc agaaacgtgg ctggcctggc tcaccacgcg	6540
ggaaacggtc tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt	6600
cacattcacc accctgaatt gactcttcc cggcgctat catgccatac cgcaaaagg	6660
tttgcgcatt tcgatgggtt cgggatctc gacgctctcc cttatgcgac tcctgcatta	6720
ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc cgccgcaagg aatggatcat	6780
gcaaggagat ggcggccaaac agtccccgg ccacggggcc tgccaccata cccacgccc	6840
aacaaggcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc cccatcggtg atgtcggtga	6900
tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggtgatgcc ggccacgatg cgtccggcgt	6960
agaggatcga gatcttgcac atccctatca gtgatagaga ttgacatccc tatcagtgt	7020
agagatactg agcacatcag caggacgcac tgaccgattt cattaaagag gagaaaggta	7080
ccatggaga aagcttgggtt aaggaccac gtgattacaa cccgatatcg agcaccattt	7140

gtcatttgcac	aatgaatct	gatggcaca	caacatcg	ttgtatgg	tattgg	7200	
ccttcatcat	tacaaacaag	cacttgttta	gaagaaataa	tggaaact	gttgc	7260	
cactacatgg	tgtattcaag	gtcaagaaca	ccacgactt	gcaacaac	acac	7320	
ggagggacat	gataattatt	cgcgc	cttgc	accattc	cataaa	7380	
aatttagaga	gccacaaagg	gaagagcg	ca	tatgtctt	gt	7440	
agagcatgtc	tagcatgg	tcagacacta	gttgcac	attcc	tatgt	7500	
tctggaa	gca	accaggat	ggc	actgtgt	gg	7560	
gagatgg	ttt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	7620	
tcacaagcgt	gccgaaa	ac	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	7680	
tttaggttg	g	cgattaa	atgtact	tttgcatt	tttgcatt	7740	
tgaaac	cttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	7800	
tgtactcg	ca	atgatagg	tccgg	ctgtct	gttgcatt	7860	
gctgccacc	ctg	acttgcatt	acttgcatt	acttgcatt	acttgcatt	7920	
ggtttttgc	tgaaagg	agg	acttat	cc	ggatatccc	7980	
gcataac	aa	gcctatgc	ac	ggatatccc	caagagg	ccc	8040
cattgttag	ttt	catac	gg	gcctgc	tttgcatt	tttgcatt	8100
cgcattaa	ag	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	tttgcatt	8135

<210> 49

< 211> 1905

< 212> ADN

5 < 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP ELP1-120

<400> 49

cactctgac	gtt	ttt	cac	tgacaact	actcgtct	gc	gtt	aaa	acagat	ggctgtt	aaa	60
aagtac	ct	act	tat	cct	gaacgtac	cc	ggcgtgg	tt	ccggcgt	gggtgtt	cc	120
gg	tg	gg	cc	gg	cc	gg	tt	cc	gg	tt	cc	180
gg	tt	gg	tt	gg	tt	cc	gg	tt	gg	tt	cc	240
gg	cc	gt	gg	cc	gt	cc	gg	cc	gt	gg	cc	300
gg	tt	gg	tt	gg	tt	cc	gg	tt	gg	tt	cc	360
gg	tc	gg	tc	gg	tc	cc	gg	tc	gg	tc	cc	420
gg	tt	gg	tt	gg	tt	cc	gg	tt	gg	tt	cc	480
gg	tt	gg	tt	gg	tt	cc	gg	tt	gg	tt	cc	540
gg	cc	gt	gg	cc	gt	cc	gg	cc	gt	gg	cc	600

ES 2 870 914 T3

ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg	660
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg	720
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc	780
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc	840
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct	900
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg	960
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg	1020
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc	1080
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc	1140
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct	1200
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg	1260
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg	1320
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc	1380
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc	1440
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct	1500
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg	1560
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg	1620
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc	1680
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc	1740
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct	1800
ggtgttaggtg tgccgggtgt tggtgtgccc ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg	1860
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccc ggcgtggccgt gataa	1905

<210> 50

< 211> 633

< 212> PRT

5

< 213> Secuencia Artificial

<220>

< 223> VIP ELP1-120

<400> 50

His	Ser	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Asp	Asn	Tyr	Thr	Arg	Leu	Arg	Lys	Gln
1				5					10				15		

Met	Ala	Val	Lys	Lys	Tyr	Leu	Asn	Ser	Ile	Leu	Asn	Val	Pro	Gly	Val
20					25							30			

ES 2 870 914 T3

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
35 40 45

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
50 55 60

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro
65 70 75 80

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly
85 90 95

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
100 105 110

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
115 120 125

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val
130 135 140

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
145 150 155 160

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
165 170 175

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
180 185 190

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
195 200 205

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
210 215 220

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
225 230 235 240

Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
245 250 255

Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala
260 265 270

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
275 280 285

ES 2 870 914 T3

Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val
290 295 300

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro
305 310 315 320

Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
325 330 335

Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val
340 345 350

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
355 360 365

Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val
370 375 380

Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro
385 390 395 400

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly
405 410 415

Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val
420 425 430

Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly
435 440 445

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val
450 455 460

Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Val Pro
465 470 475 480

Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly
485 490 495

Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val
500 505 510

Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly
515 520 525

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val

ES 2 870 914 T3

530

535

540

Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro
545 550 555 560

Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly
565 570 575

Gly Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
580 585 590

Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
595 600 605

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val
610 615 620

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica para el uso en un método para el tratamiento de una cardiopatía, en donde el método comprende administrar a un sujeto la composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un VIP que tiene una metionina N-terminal que incrementa la preferencia del péptido VIP para VPAC2 frente a VPAC1 y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 con la His N-terminal en la posición 2, y que tiene un péptido similar a elastina (ELP) en el extremo C, teniendo el ELP de 75 a 130 unidades de VPGXG (SEQ ID NO:3), donde la composición de X es de 40% a 60% de Val, de 10% a 30% de Ala y de 20% a 40% de Gly.
- 10 2. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición prolonga la fase de absorción desde una zona de inyección y alarga la semivida circulatoria del VIP.
- 15 3. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la composición está formulada para la administración parenteral.
- 20 4. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 3, en donde la composición está formulada para la administración subcutánea, intramuscular o intravenosa.
- 25 5. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la cardiopatía se selecciona del grupo que consiste en hipertensión, insuficiencia cardíaca, fibrosis miocárdica o cardiomiopatía.
- 30 6. La composición farmacéutica para el uso en el tratamiento de la hipertensión según la reivindicación 5, en donde el sujeto tiene hipertensión seleccionada de hipertensión pulmonar, hipertensión esencial descontrolada e hipertensión resistente.
7. La composición farmacéutica para el uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, en donde en el método la composición se administra de una a tres veces por semana o se administra aproximadamente de forma diaria.
8. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 1, en donde la administración de la composición a un sujeto disminuye la presión sanguínea en el sujeto.
9. La composición farmacéutica para el uso según la reivindicación 8, en donde se disminuye la presión sanguínea arterial diastólica, sistólica y/o media.

FIGURA 1

SEQ ID NO. 14

M-VIP ELP1-120 (M añadida al extremo N de VIP)

ELP1-120 = (VPGXG)₁₂₀ donde X = V₅G₃A₂

FIGURA 2

SEQ ID NO. 15

MAA-VIP ELP1-120 (antes del procesamiento, se añade MAA al extremo N de VIP)

$$\text{ELP1-120} = (\text{VPGXG})_{120} \text{ donde X} = \text{V}_5\text{G}_3\text{A}_2$$

FIGURA 3

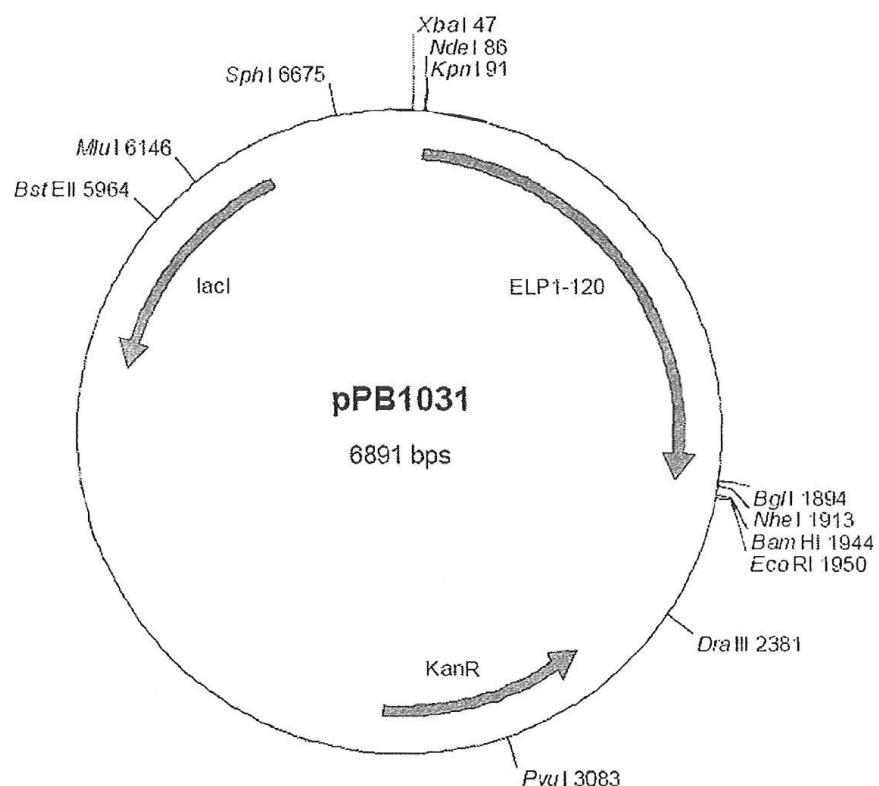
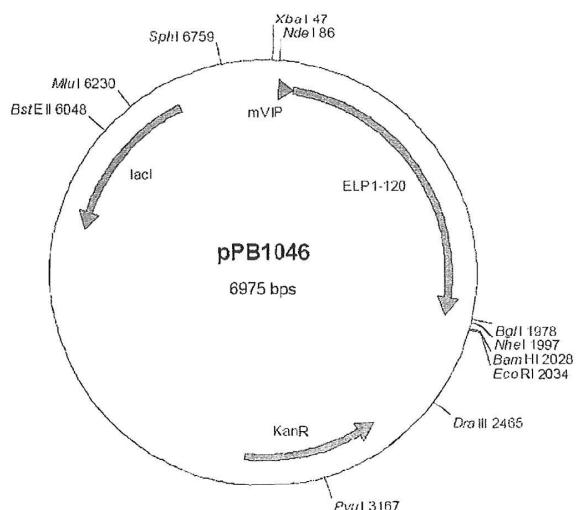


FIGURA 4



XbaI
 P0045
 aattCTCTA GAAATAATT
 1 taatacgaact cactataggg gaatttgttag cggtataacaa ttccctctta gaataatatt
 attatgtga gtgatataccc cttaaacttc gcttattgtt aaggggagat ctttatlaaa
 GAGAT CTTTATTAAA
 < P0048

NdeI
 P0064
 CTGTTTCA CTGACAACTA

P0045 >
 TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GCACTCTGAC G
 61 tggtaaactt taagaaggag atatacatat gcaacttgcg gtttttca ctgacaacta
 acaattggaa atttttctc tatatgtata cgtgagactg cgacaaaatgt gactttgtat
 ACAAAATTGAA ATTCTTCCTC TATATGTATA CGTGAGACTG CGACAAAAGT GACTTTGTAT

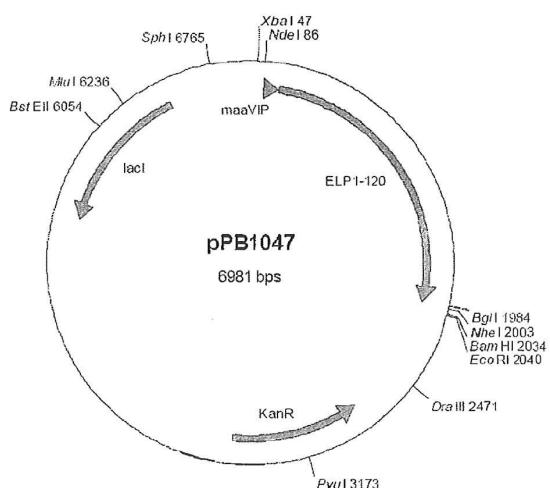
P0048
 >>.....mVIP.....>
 m h s d a v f t d n

P0064 >
 CACTCGTCTG CGTAAACAGA TGGCTGTTAA AAACTACCTG AACTCTATCC TGAACGTAC
 121 cactcgctg cgtaaacaga tggctgttaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc
 gtgagcagac gcatrtgtct accgacaaatt ttccatggac ttgagatagg acttgcattgg
 G

P0048
 TGAGCAGAC GCATTGTCT ACCGACAATT TTTCATGGAC TTGAGATAGG ACTTG
 < P0065
 >.....mVIP.....>>>..
 y t r l r k q m a v k k y l n s i l n v

181 gggcggtgggt gttccggggg tggtgtttcc gggtgggggt gtggccggggg cagggtgtcc
 cccgcaccca caaggccccgc accccaccaagg ccacacccca cccggccccgc gtcacacaagg
 >>.....ELP1-120.....>
 p g v g v p g v g v f g g v v p g a g v

FIGURA 5



+----- P0066
 CTA GAAATAATT
 1 taatacgaact cactataggg gaatttgtgag cggataacaa ttccctctta gaaataattt
 attatgtga gtgatatccc ctttaacactc gcctatgtt aaggggagat cttttattaaa
 TTTTATTAAA
 K P0067
 NdeI
 ---+-----
 P0064
 CTG TTTTCACTGA
 P0066 >
 TGTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GCGGCCGAC TCTGACG
 61 tggtaaactt taagaaggag atatacatat ggccggccac tctgacgtgt ttttactgt
 acaaattgaa attcttcctc tatatgtata ccccccgtgt agactgcgac aaaagtgtact
 ACAAAATTGAA ATTCTTCCTC TATATGTATA CGCCCGGGTG AGACCTCGAC AAAAGTGA
 P0067
 >>.....mVIP.....>
 m a a h s d a v f t

 P0064
 CAACTACACT CGCTCTGCCTA AACAGATGAG ATCTAAAG TACCTGAACCT ATATCTGAA
 121 caactacact cgtctgcgtt aacagatggc tggtaaaag tacctgttcttcaatgttca
 gttgatgtga cccggccat ttgtcttccat acaatttttc atggacttga gataggactt
 GTGATG
 P0067
 TGA GCAGACCGAT TTGTCTACCG ACAATTTCATGGACTTGA GATAGGACTT
 < P0065
 >.....mVIP.....>
 d n y t r l r k q m a v x k y l n s i l

 P0065
 G
 P0064 >
 CGTAC
 181 cgtacccggc gtgggtgttc cgggggtggg tgggtgggtt ggggggtgtc cggggggcgg
 gatggccggc caccacaaag cccggccaccc acaaggccca cccggccacacgg cccggccgttc
 > mVIP
 n
 >>.....ELP1-120.....>
 v p q v q v p q v g v p q g g v p q a

FIGURA 6

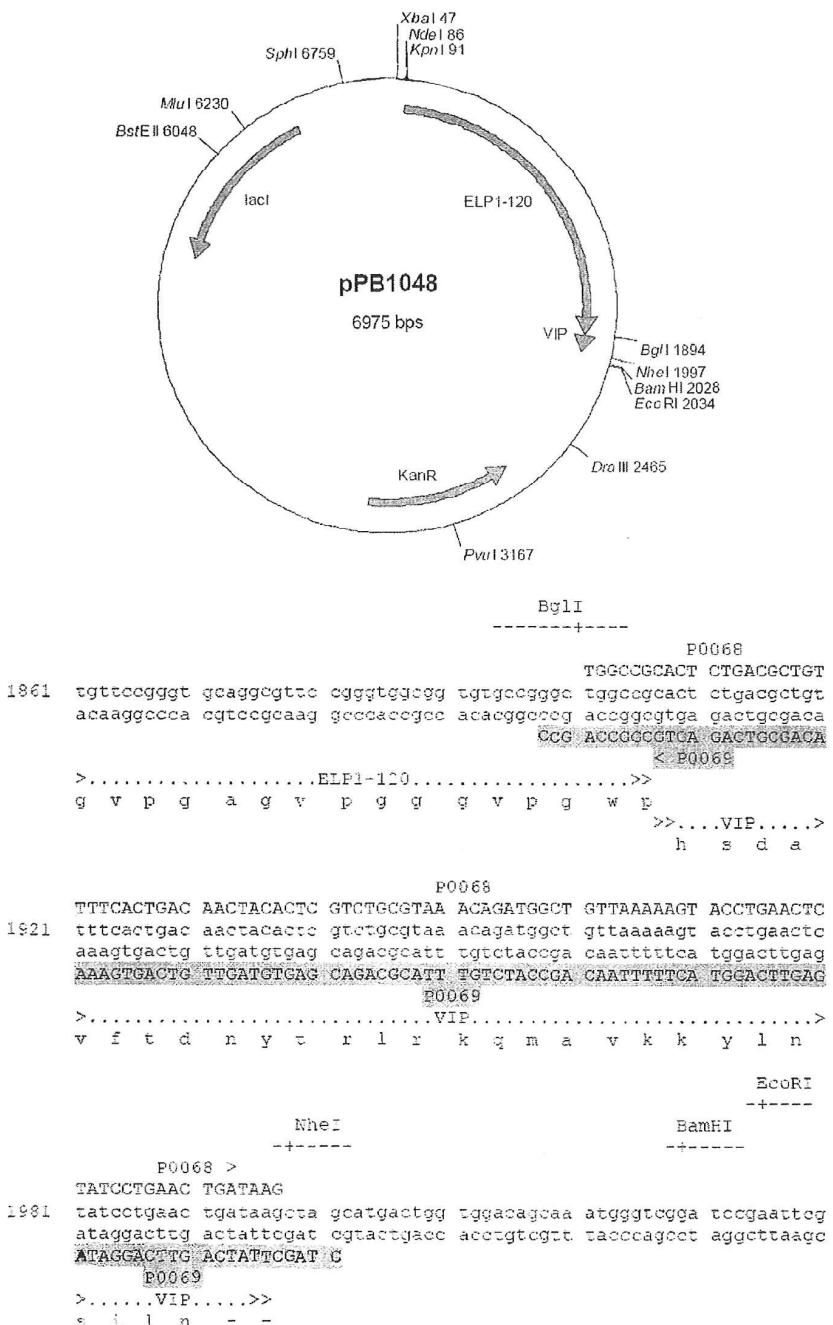
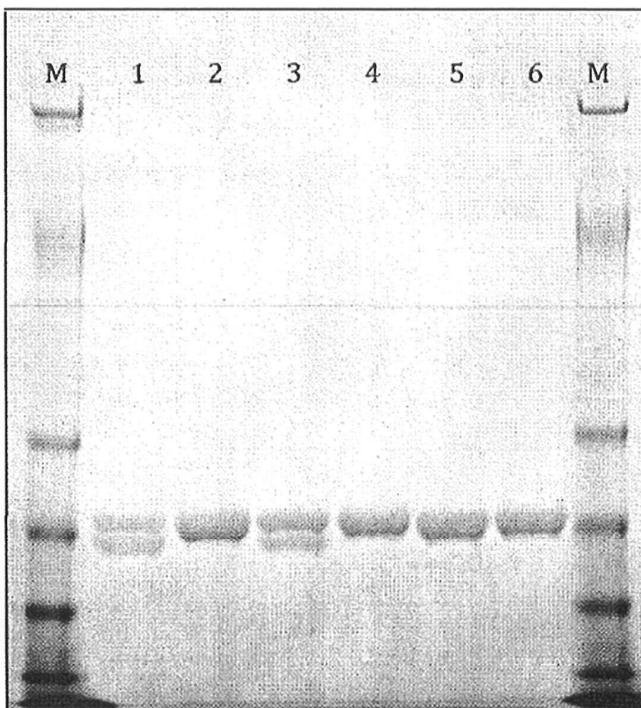


FIGURA 7
NuPAGE en Acetato de Tris al 10%



- M. Marcador del peso molecular
- 1. PB1046
- 2. PB1046 calentada
- 3. PB1047
- 4. PB1047 calentada
- 5. PB1048
- 6. PB1048 calentada
- M. Marcador del peso molecular

FIGURA 8

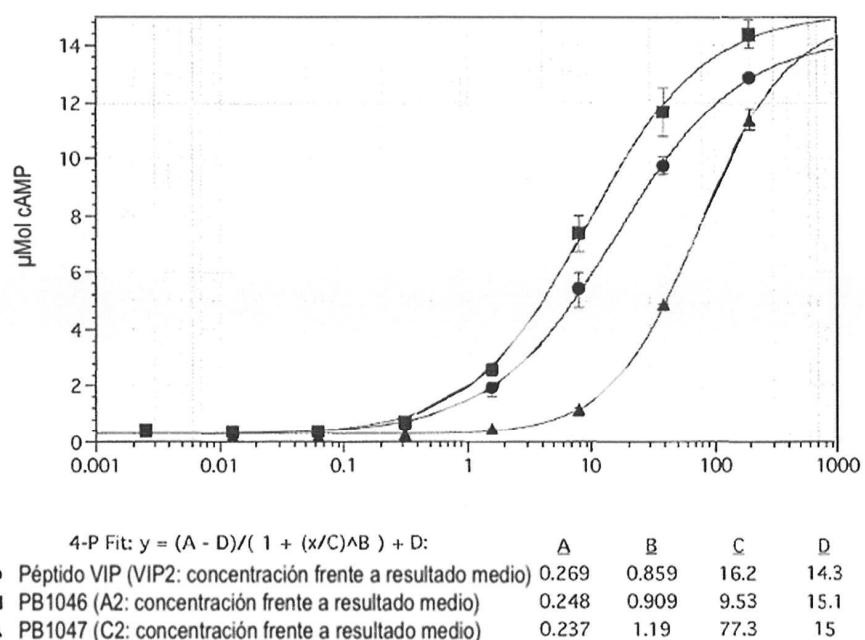
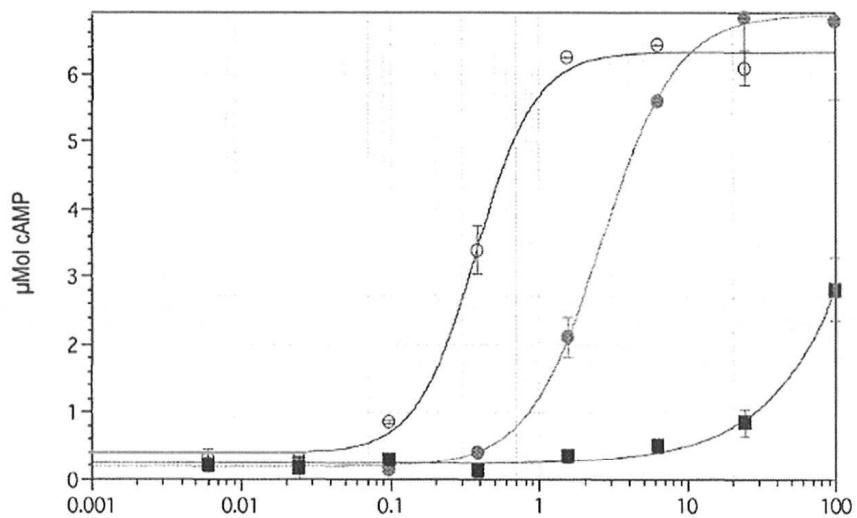


FIGURA 9



$$4\text{-P Fit: } y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D; \quad \begin{matrix} A & B & C & D & R^2 \end{matrix}$$

● PB1047 (B: concentración frente a resultado medio)	0.182	1.73	2.66	6.87	1
■ PB1046 (C: concentración frente a resultado medio)	0.224	0.96	1.88e+08	2.72e+06	0.993
○ Péptido VIP (VIP: concentración frente a resultado medio)	0.386	2.15	0.379	6.32	0.997

FIGURA 10

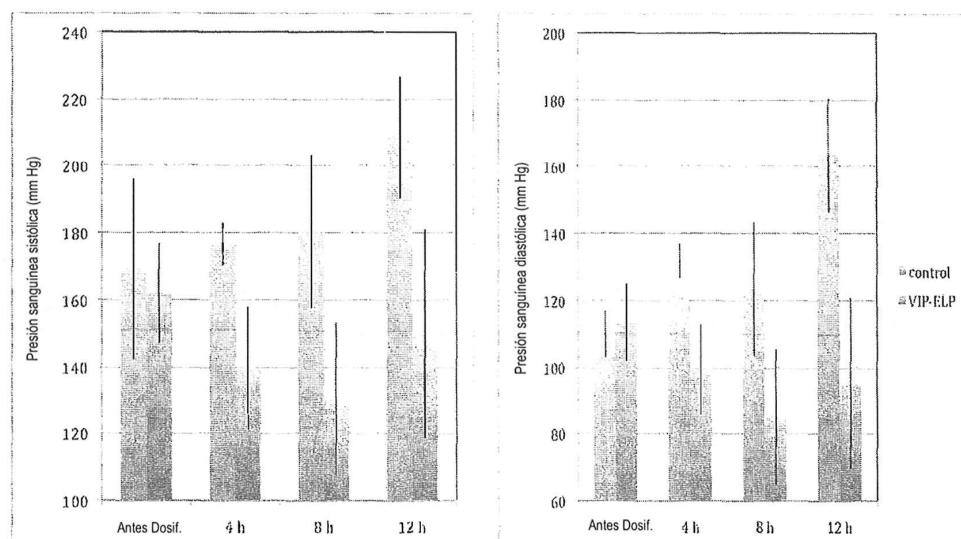


FIGURA 11

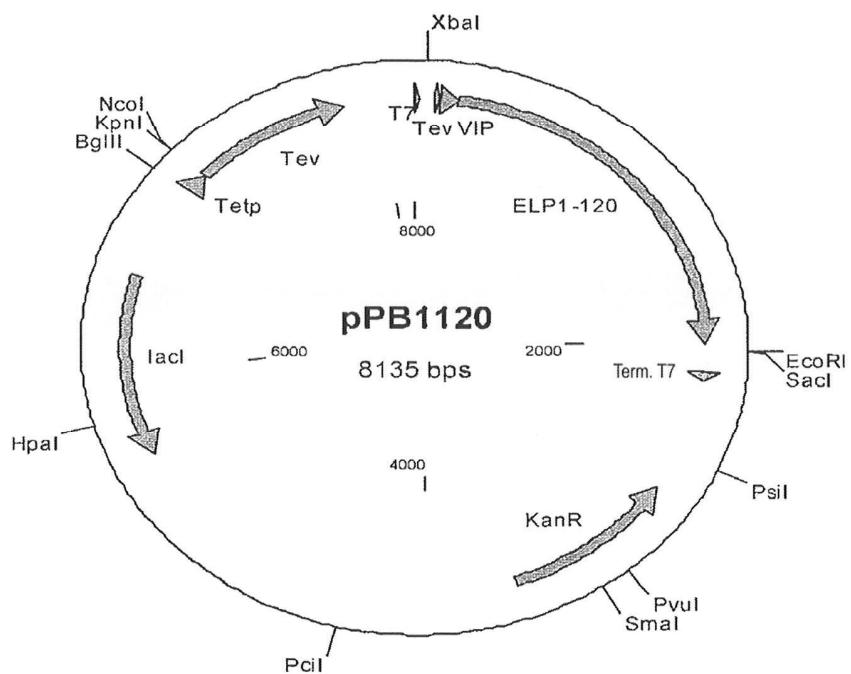


FIGURA 12

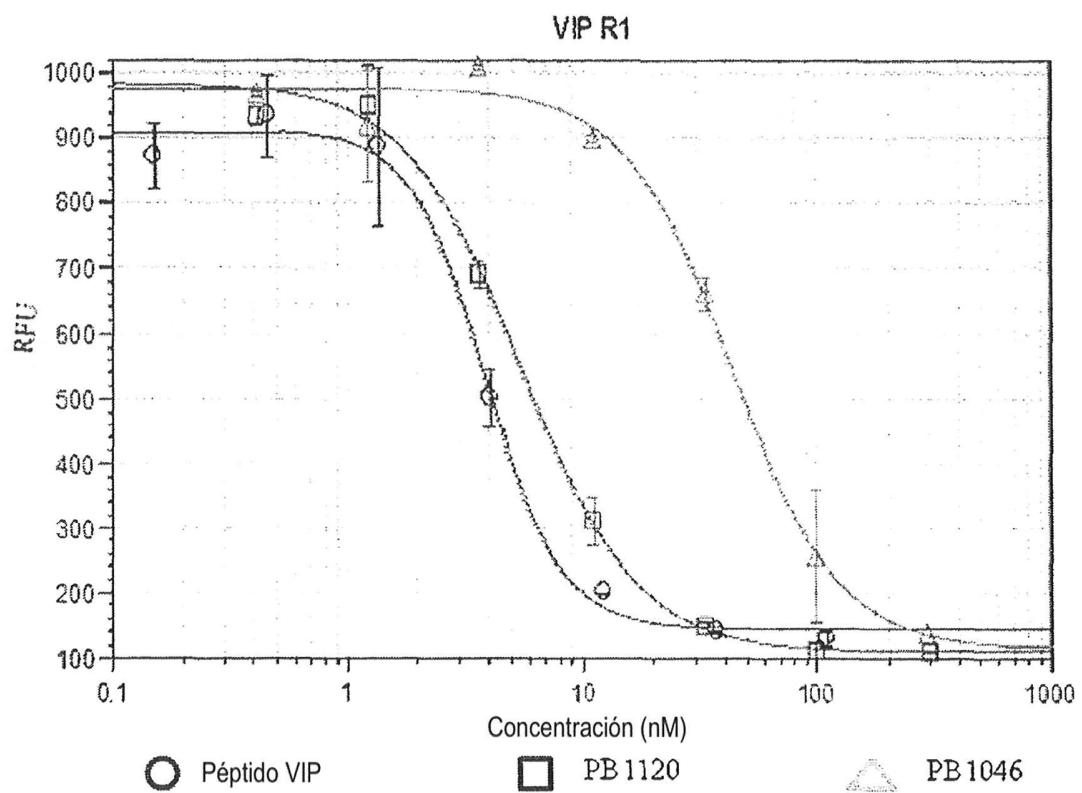


FIGURA 13

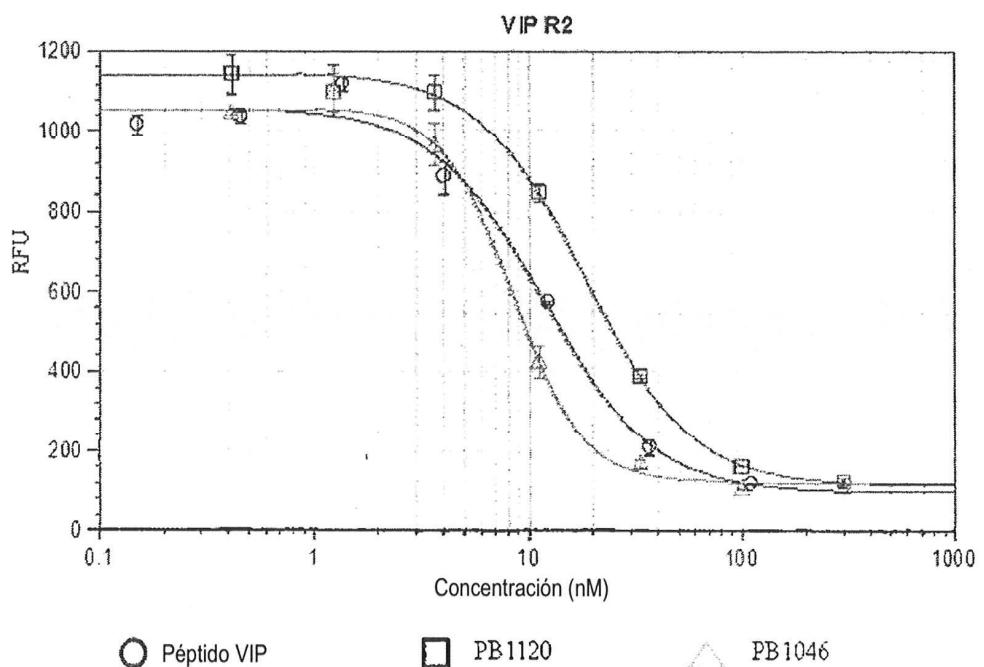
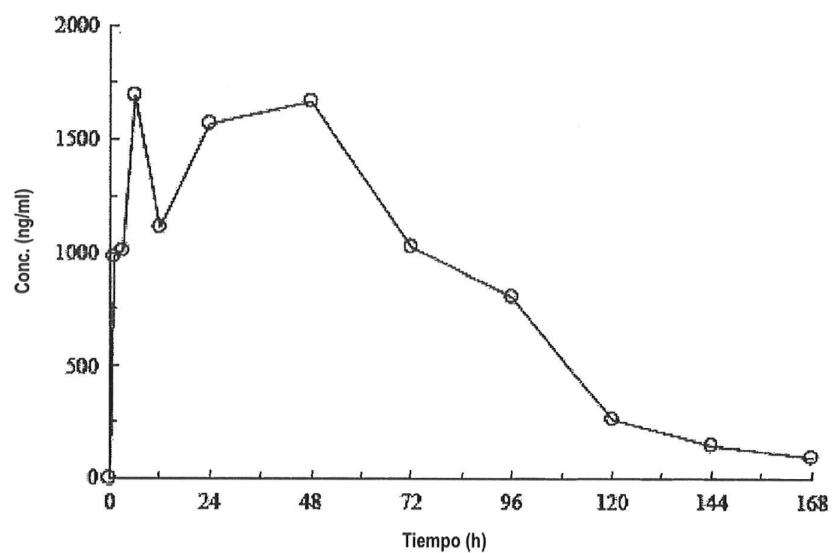


FIGURA 14

A



B

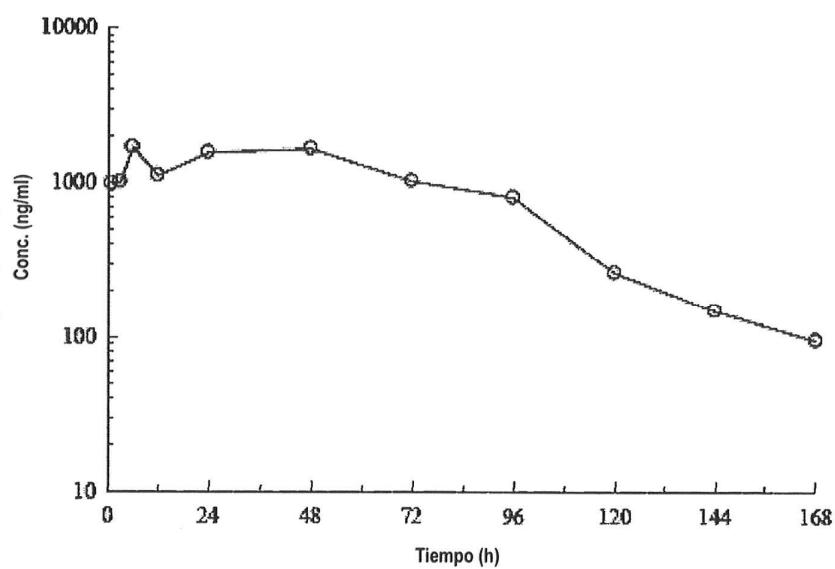


FIGURA 15A

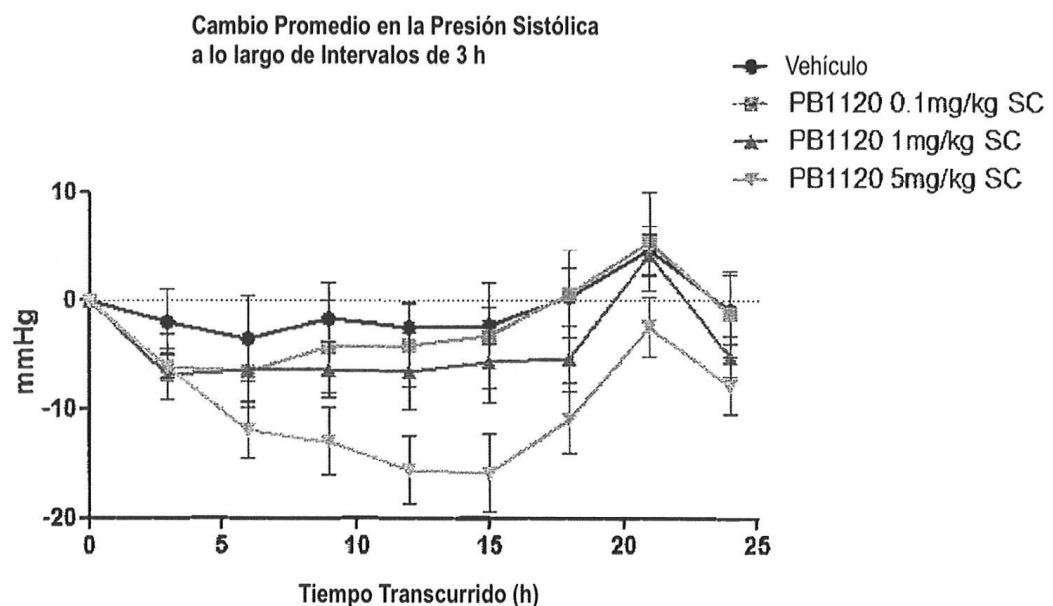


FIGURA 15B

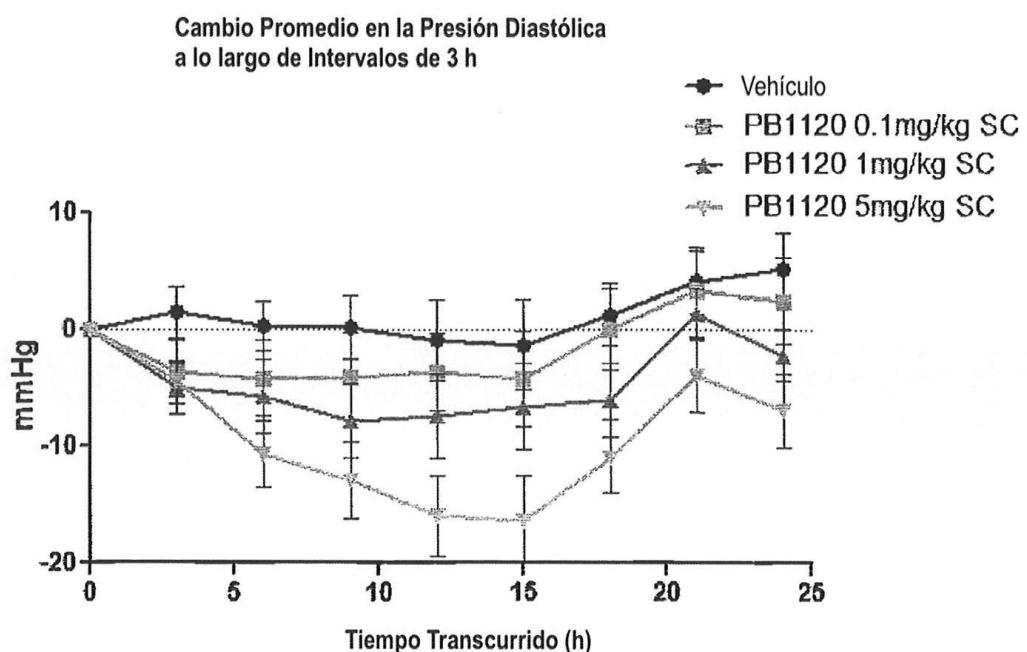


FIGURA 15C

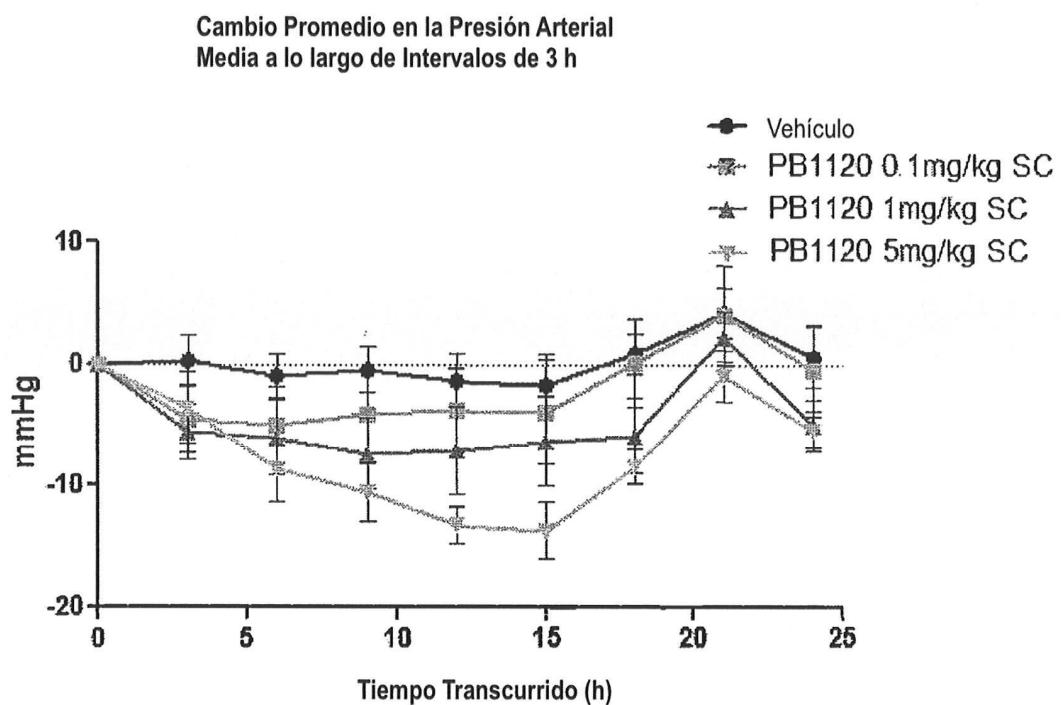


FIGURA 15D

