



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 296 872**

⑮ Int. Cl.:

**A61K 38/19** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

**C07K 14/525** (2006.01)

⑫

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02077256 .2**

⑯ Fecha de presentación : **10.08.1999**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1264599**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **11.12.2002**

⑭ Título: **Péptidos derivados de TNF para uso en el tratamiento de edema.**

⑩ Prioridad: **14.08.1998 EP 98870180**  
**18.09.1998 EP 98870198**  
**21.10.1998 EP 98870222**

⑬ Titular/es: **Rudolf Lucas**  
**Frits van den Bergelaan 83**  
**2630 Aartselaar, BE**

⑮ Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**01.05.2008**

⑯ Inventor/es: **De Baetselier, Patrick;**  
**Lucas, Rudolf;**  
**Pugin, Jérôme;**  
**Bloc, Alain y**  
**Fransen, Lucie**

⑮ Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**01.05.2008**

⑭ Agente: **Carpintero López, Francisco**

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 derivados de TNF para uso en el tratamiento de edema.

### 5 Campo de la invención

La presente invención se basa en el hallazgo de los péptidos derivados de un dominio específico de factor alfa de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) se pueden usar de manera eficaz para tratar edema. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de péptidos derivados de la región de TNF- $\alpha$  humano de Ser<sup>100</sup> a Glu<sup>116</sup> para tratar edema pulmonar. Por ejemplo, el péptido circularizado que tiene la secuencia de aminoácidos CGQRETPEGAEAKPWYC se muestra que es muy eficaz en la inducción de resorción de edema.

### Antecedentes de la invención

15 El transplante de pulmón se muestra que es exitoso en el tratamiento de pacientes con enfermedad pulmonar en la fase final. Sin embargo, el edema pulmonar o edema (ambos términos se pueden usar de manera indistinta) después de la repercusión del transplante es un problema clínico principal para el que no existe un fármaco eficaz en este momento. Además, la evidencia reciente indica que el endotelio juega un papel esencial en la regulación de la interacción dinámica entre la vasodilatación y vasoconstricción pulmonar y es el objetivo principal durante 20 la isquemia/reperfusión y lesión pulmonar relacionada con síndrome de insuficiencia respiratoria (ARDS). De este modo, dado que el edema pulmonar a menudo da como resultado el rechace de transplante de pulmón y que existe una carencia persistente de pulmones disponibles para el transplante, existe una necesidad urgente de evitar o tratar de manera eficaz el edema pulmonar.

25 Durante la isquemia y reperfusión (I/R), tiene lugar una inducción típica de citoquinas inflamatorias como factor alfa de necrosis tumoral (TNF). TNF es una citoquina pleiotrópica, producida principalmente por macrófagos activos, que se sintetiza como una molécula transformada que se puede liberar por las metaloproteinadas de la superficie celular en la circulación (Gearing *et al.*, 1994). TNF se ha mostrado que se une a al menos dos tipos de receptores unidos a membrane, el receptor 1 de TNF (55 kD) y el receptor 2 de TNF (75 kD), que se expresan en la mayoría de las 30 células somáticas, con la excepción de los eritrocitos y linfocitos T no estimulados. TNF se puede considerar como una espada de dos filos: de hecho, cuando se produce en exceso, TNF se ha mostrado que está implicado en la patología de diversas enfermedades infecciosas, tales como sepsis inducida por LPS (Beutler *et al.*, 1985), malaria cerebral (Grau *et al.*, 1987), así como la mortalidad asociada a tratamiento en African trypanosomiasis (Lucas *et al.*, 1993). Por el contrario, TNF se mostró que es uno de los agentes más protectores eficaces contra el ligamiento cecal y peritonitis 35 séptica inducida por punción en ratones y ratas (Echtenacher *et al.*, 1990, Alexander *et al.*, 1991; Lucas *et al.*, 1997) y está implicado en la defensa de huésped durante la neumonía por neumococos en ratones (van der Poll *et al.*, 1997). Además, se ha mostrado que los ratones deficientes en el receptor 1 de TNF son significativamente más eficaces a la 40 infección por *Listeria monocytogenes* (Rothe *et al.*, 1993; Pfeffer *et al.*, 1993) y *Mycobacterium tuberculosis* (Flynn *et al.*, 1995) así como contra infecciones fúngicas (Steinshamm *et al.*, 1996) y por *Toxoplasma* (Deckert-Schluter *et al.*, 1998). Por lo tanto, se hace evidente que aparte de sus efectos prejudicial durante la producción en execso o durante la secreción crónica prolongada, TNF también es uno de los agentes más protectores contra infecciones por diversos patógenos. A este respecto, los péptidos derivados de TNF se ha sugerido que se usan como tratamiento contra (DE 3841759 to Böhm *et al.*)

45 Aparte de ejercer una pléthora de efectos mediados por la activación de sus dos tipos de receptores (receptor 1 de TNF, 55 kD, y receptor 2 de TNF 75 kD), TNF también media las actividades independientes de receptor. El dominio extremo de TNF se localiza en la parte superior de la estructura en forma de campana y es de manera espacial distinto de sus sitios de unión al receptor, que se localizan en la base de la molécula trimérica (Lucas *et al.*, 1994). Este dominio tiene afinidad de tipo lecitina para oligosacáridos específicos tales como trimanosa y diacetilquiotibiosa. Tanto TNF como el péptido de extremo de TNF son capaces de mediar una actividadtriptanolíptica mediante interferencia con la integridad liposomal del tripanosoma, un efecto dependiente de pH que implica probablemente la inserción de TNF en la membrana liposomal (Magez *et al.*, 1997). Además, los mutantes del péptido de extremo en el que tres aminoácidos críticos T(105); E(107); E(110) se reemplazaron por A, (Lucas *et al.*, 1994). Un triple de mutante de TNF de ratón (mTNF), T105A-E107A- E110A (de aquí en delante denominado mTNF), carece de la afinidad triptanolítica y de tipo 50 lecitina a oligosacáridos cuando se compara con el TNF de tipo salvaje. El triple de TNF tiene toxicidad sistémica reducida de manera significativa cuando se compara con mTNF de tipo salvaje *in vivo*, pero retiene su efecto protector de peritonitis en un modelo murino (Lucas *et al.*, 1997).

60 Otra actividad independiente del receptor de TNF es su inserción en membrane y capacidad de formación de canal (Baldwin *et al.* 1996). De hecho, otros han mostrado que TNF forma una canal de Na<sup>+</sup> -en un modelo de bicapa de lípido artificial, una actividad que disminuye el pH, probablemente debido a que requiere el "rompimiento" del trímero, de esta manera se expone los restos hidrófobos a la membrana (Kagan *et al.*, 1992).

65 Las observaciones recientes han indicado la instalación del anticuerpo neutralizante de TNF en los pulmones de ratas 5 min antes de la inducción bacteriana inhibe el incremento de la eliminación líquida intraalveolar, que se sabe que está dirigida por una carga en el contenido en sodio dentro de las células en las células epiteliales alveolares. Además, la instalación de TNF en ratas normales incrementa la eliminación de líquido intraalveolar en un 43% en 1 hora (Rezaiguia *et al.*, 1997). Aunque los hallazgos posteriores indican que TNF se podrían usar para inducir la

eliminación del líquido alveolar, el TNF de tipo salvaje se puede usar de manera terapéutica debido a su alta toxicidad sistémica. La presente invención se refiere al uso de un grupo seleccionado de péptidos derivados de TNF que pueden, para la sorpresa de los inventores, usarse de manera eficaz para inducir resorción de edema y que, comparado con el TNF de tipo salvaje, pérdida de toxicidad sistémica.

5

## Objeto de la invención

Está claro que existe una necesidad urgente para prevenir o evitar el edema pulmonar. Aunque algunos datos demuestran que TNF podrían estar implicados en la resorción de edema, es evidente que esta molécula pleyotrópica y 10 potencialmente tóxica no se puede usar para tratar el edema.

A este respecto, la presente invención intenta proporcionar una molécula no tóxica con la misma resorción de edema que induce tanta capacidad como TNF. Más específicamente, la presente invención intenta proporcionar péptidos no tóxicos derivados de TNF que se pueden usar para evitar o tratar edema. Además, la presente invención intenta 15 proporcionar una composición farmacéutica que proporciona un nuevo uso médico de los péptidos tripanocidiales derivados de TNF como ha descrito Lucas *et al.* (1994) y sus fragmentos o variantes.

Todos los objetos de la presente invención se considera que han cumplido con las realizaciones como se establece más adelante.

20

## Breve descripción de los dibujos

Figura 1: (A) Relación corriente - tensión en células del endotelio microvasculares de pulmón de tipo murino, preincubación durante 30 min con wt mTNF (100 ng/ml) o tampón NES a pH 6 y a pH 7,3. Los valores representan 25 las medias de  $\geq 5$  células  $\pm$  ETM (\*:  $P \leq 0,05$ ). (B) Cantidades pequeñas de corriente característica de un MVEC de pulmón tratado previamente con medio (parte superior) o con 100 ng/ml de TNF (parte inferior) a pH 6,0.

Figura 2: Relación corriente - tensión en macrófagos peritoneales residentes aislados de (A) control y (B) ratones TNFR 1/2 0/0 Cb/BL/6. La células se trajeron previamente durante 30 min con medio, wt mTNF (100 ng/ml) o péptido 30 Ltip (100  $\mu$ g/ml).

Los valores indicando las medias de  $\geq 5$  células  $\pm$  ETM (\*:  $P \leq 0,05$ ).

Figura 3: Efecto de amilorida (100  $\mu$ M), añadido durante 30 min durante la etapa de incubación previa, en incremento inducido por wt mTNF en la conductancia de membrana en MVEC. Comparación del efecto de mTNF triple 35 (100 ng/ml) y wt de mTNF (100ng/ml), tras 30 min de incubación previa con MVEC de pulmón. Los valores indican las medias de  $\geq 5$  células  $\pm$  ETM (\*:  $P < 0,05$ ).

Figura 4: (A) Efecto de Ltip (100  $\mu$ g/ml) contra los controles en MVEC de pulmón CBA a pH 6 y pH 7,3. (B) 40 Comparación del efecto de 30 min de incubación previa de MVEC con péptido Ltip, péptido mutTip, y péptido scramblTip a pH 6. Efecto de amilorida (100 mM) añadido durante la incubación previa, sobre el incremento inducido por el péptido Ltip en la conductancia de membrana en MVEC. Los valores indican la media de  $\geq 5$  células  $\pm$  ETM (\*:  $P \leq 0,05$ ).

Figura 5: Efecto del péptido de extreme mTNF (1  $\mu$ g/pulmón) en el cambio del peso de pulmón (en g) durante un 45 experimento de perfusión de pulmón que dura 150 min.

Figura 6: Efecto de mTNF de tipo salvaje (●, 1  $\mu$ g/pulmón) o péptido de extremo mTNF (▲, 1 mg/pulmón) contra 50 controles [○, NaCl] sobre el cambio de peso de pulmón (en % contra la línea base de pulmón a 30 min) durante los experimentos de perfusión de pulmón aislado después de 150 min. Cada símbolo [○, ● o ▲] representa un pulmón.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al uso de un péptido que comprende una cadena de 7 a 17, preferiblemente una 55 cadena de 11 a 16, más preferiblemente una cadena de 13 a 15 y lo más preferiblemente una cadena de 14 aminoácidos contiguos derivados de la región de TNF- $\alpha$  humano de Ser<sup>100</sup> a Glu<sup>116</sup> o desde la región de TNF- $\alpha$  de ratón de Ser<sup>99</sup> a Glu<sup>115</sup> para la fabricación de un medicamento para tratar edema. Más específicamente la presente invención se refiere al uso de un péptido como se ha descrito anteriormente en el que dicha cadena de 14 aminoácidos contiguos se eligen entre el grupo constituido por las secuencias de aminoácidos contiguos QRETPEGAEAKPWY (SEQ ID NO 60 1) y PKDTPEGAEELKPWY (SEQ ID NO 2) como se ha descrito por Lucas *et al.* (1994). Las últimas secuencias se proporcionan en el código de una letra bien conocido para los aminoácidos (además el código de tres letras se unas algunas veces).

El término “péptido” se refiere a un polímero de aminoácidos (aa) derivado del dominio TNF tripanolítico que 65 tiene afinidad de tipo lectina como se describe por Lucas *et al.* (1994). Además, el ultimo término se refiere a un polímero de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 aminoácidos contiguos derivados de la región de TNF- $\alpha$  humano Ser<sup>100</sup> a Glu<sup>116</sup> o de la región de TNF- $\alpha$  de ratón Se<sup>99</sup> a Glu<sup>115</sup>. Las últimas regiones de TNF también se refieren a las regiones mostradas en la Fig. 5, p. 172 de Pennica y Goeddel en Webb y Goeddel, eds. (1987). Sin embargo, debe

quedar claro que la región de TNF- $\alpha$  humano Ser<sup>100</sup> a Glu<sup>116</sup> es idéntica a TNF- $\alpha$  humano de Ser<sup>99</sup> a Glu<sup>116</sup> en la Fig. 5, p. 172 de Pennica y Goeddel en Webb y Goeddel, eds. (1987) y la región de TNF- $\alpha$  de ratón de Ser<sup>99</sup> a Glu<sup>115</sup> es idéntica a TNF- $\alpha$  de ratón de Ser<sup>99</sup> a Glu<sup>115</sup> en la Fig. 5, p. 172 de Pennica and Goeddel en Webb y Goeddel, eds. (1987). El término “péptido” más específicamente se refiere a un péptido que comprende el hexámero TPEGAE (SEQ ID NO 3) de las últimas regiones de TNF o cualquier péptido que comprende los aminoácidos correspondientes T, E y E o el hexámero posterior que se muestra que son los tres aminoácidos críticos según Lucas *et al.* (1994). Debe resultar evidente que la presente invención se refiere a cualquier péptido derivado las las últimas regiones de TNF y no excluye las modificaciones después de la traducción de los péptidos tales como glicosilación, acetilación, fosforilación, modificaciones con ácidos grasos y similares, que se incluyen en la presente invención son, por ejemplo, péptidos que contienen uno o más análogos de un aa (incluidos aa naturales), péptidos con enlaces sustituidos, versiones mutadas o variaciones de secuencia natural de los péptidos, péptidos que contienen enlaces disulfuro entre restos de cisteína, así como otros modificaciones conocidas en la técnica. Los péptidos de la presente invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica tal como la síntesis química, como se ha descrito por Houbenweyl (1974) y Atherton & Shepard (1989), o mediante técnicas de ADN recombinante como se describe por Maniatis *et al.* (1982) y, más específicamente, por Lucas *et al.* (1994).

El término edema (o edema) se refiere a cualquier acumulación en exceso anormal de (suero) fluido en el tejido conectivo o en la cavidad serosa, en particular, el último término se refiere a edema pulmonar (véase también la sección de los *Ejemplos*).

Además, la presente invención se refiere al uso de un péptido como se ha descrito anteriormente en el que dicho péptido es circularizado. Más específicamente, la presente invención se refiere al uso de un péptido como se ha descrito anteriormente, en el que dicho péptido se hace circularizado reemplazando los aminoácidos NH<sub>2</sub>- y COOH terminal por cisteína de manera que se forma un puente disulfuro entre las últimas cisternas. A este respecto, la presente invención se refiere al uso de un péptido como se ha descrito anteriormente en el que dichos péptidos circularizados se eligen entre el grupo constituido por los péptidos circularizados CGQRETPEGAEAKPWYC (SEQ ID NO 4) y CGPKDTPEGAEELKPWYC (SEQ ID NO 5) como se ha descrito por Lucas *et al.* (1994).

La presente invención finalmente se refiere a una composición farmacéutica para tratar edema que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente. El término “una composición farmacéutica para tratar edema” se refiere a cualquier composición que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente que previene, mejora o cura el edema, en particular edema pulmonar. Más específicamente, el término “una composición farmacéutica para tratar edema” o “un fármaco o medicamento para tratar edema” (ambos términos se pueden usar de manera indistinta) se refieren a una composición que comprende un péptido como se ha descrito anteriormente y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable (ambos términos se pueden usar de manera indistinta) para tratar edema. Los vehículos o excipientes adecuados conocidos por los expertos en la técnica son solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa, solución de Hank, aceites estables, oleato de etilo, dextrosa al 5% en solución salina, sustancias que potencian la isotonicidad y estabilidad química, tampones y conservantes. Otros vehículos adecuados incluyen cualquier vehículo que no induce el mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo receptor de la composición tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, aminoácidos poliméricos y copolímeros de aminoácidos. El “medicamento” se puede administrar mediante cualquier procedimiento adecuado dentro del conocimiento del experto. La vía preferida de administración es por vía parenteral. En la administración parenteral, el medicamento de esta invención se formulará en una dosificación unitaria inyectable a partir de tal solución, suspensión o emulsión, en asociación con los excipientes farmacéuticamente aceptables como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, la dosificación y modo de administración dependerá del individuo. En general, el medicamento se administra de manera que el péptido de la presente invención se proporciona a una dosis entre 1  $\mu$ g/kg y 10 mg/kg, más preferiblemente entre 10  $\mu$ g/kg y 5 mg/kg, más preferiblemente 0,1 y 2 mg/kg. Preferiblemente, se proporciona como una dosis de bolo. La infusión continua también se puede usar. Si es así, el medicamento se puede infundir a una dosis entre 5 y 20  $\mu$ g/kg/minuto, más preferiblemente entre 7 y 15  $\mu$ g/kg/minuto.

La presente invención se ilustrará ahora mediante referencia a los siguientes ejemplos de realizaciones particularmente ventajosas.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

#### Material y procedimientos

**Animales, células y reactivos.** Ratones macho CBA/J o C57BL/6, así como ratones TNF machos, 1/2<sup>0/0</sup> C57BL/6 deficientes en los receptores de TNF (Bruce *et al.*, 1996) proporcionados por H. Bluethmann, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Suiza, se usaron a la edad de 8-10 semanas. Su cuidado se llevó de acuerdo con la dierctrices institucionales. Se aislaron células del endotelio microvasculares de ratones BA/J y se caracterizaron como se ha descrito (Jackson *et al.*, 1990) usando perlas magnéticas (Dynabeads M-450, Dynal, Oslo, Noruega), unidas de manera covalente a anticuerpo rata-anti ratón purificado PECAM-1 (donado por B. Imhof, Universidad de Ginebra). Se volvieron a suspender células del endotelio de pulmón microvasculares en DMEM que contiene 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomicina, 20% de FCS, 40 U/ml heparina y 100 mg/ml de suplemento de de crecimiento de células endoteliales (Brunschwig Chemie, Basilea, Suiza). Para los experimentos de patch clamp, se sembraron células en placas Petri

de 35 x 10 mm de fijación fácil (Beckton Dickinson, Plymouth, Reino Unido) cubiertas previamente con gelatina al 0,2% (Sigma, Buchs, Suiza). Macrófagos peritoneales residentes, aislados en RPMI enfriados en hielo que contiene antibióticos y 10 U/ml de Heparina, se dejó que se adhirieran a las placas Petri de 35 x 10 mm de fijación fácil durante 4 h, después de lo cual las células no adherentes se retiraron. Las células se desarrollaron en RPMI 1640 que contiene 5 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 10 mg/ml estreptomicina y 10% de suero bovino fetal (todo de Gibco). Para patch clamp, se usaron los macrófagos después de 24 horas de aislamiento.

10 **TNF y péptidos.** TNF murino recombinante derivado de *E. coli* (mencionado además como TNF en el texto) y un triple mutante de TNF (mutTNF) derivado de *E. coli* (T104A-E106A-E109A) se sintetizaron como se declina en otra parte (Lucas *et al.*, 1997). Los péptidos derivados de TNF se sintetizaron con el uso de protección de grupo Fmoc-a- 15 amino (Fields *et al.* 1990), y se purificó con una columna de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa C18.

15 Se sintetizaron los siguientes péptidos derivados de TNF:

Péptido de largo extremo 99-115 (LTip) GG-CGPKDTPEGAEELKPWYC (SEQ ID NO 6)

20 Péptido de extreme mutado 99-115 (mutTip) GG-CGPKDAPAGAALKPWYC (SEQ ID NO 7)

Péptido de extreme revuelto (scamblTip) GG-CGTPKPWELGPDEKPAYC (SEQ ID NO 8)

25 Péptido de extreme corto (STip) CTPEGAEC (SEQ ID NO 9)

30 Para retener teóricamente la conformación de TNF original tanto como sea posible, los péptidos LTip, MutTip y ScamblTip se hicieron circularizados. Ser<sup>99</sup> de la secuencia de TNF se reemplazó por Cys, y Cys<sup>100</sup> por Gly de manera que se formará el puente disulfuro entre Cys<sup>99</sup> y Cys<sup>115</sup> en los péptidos. El péptido STip puede no hacerse circularizado. Los péptidos eran NH<sub>2</sub>- biotinilados.

35 **Electrofisiología.** Se trajeron las células previamente durante 30 minutos con TNF, péptidos mutTNF y tip a 37°C en un tampón que consistía en 145 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-glucosa, y 10 mM Hepes, y ajustado de pH con NaOH hasta el valor requerido. Despues las células se lavaron con el mismo tampon ajustado a pH a 7,3, y se realizaron experimentos usando la técnica de registro de célula entera, sellado ajustado. Se registraron las 40 corrientes con un amplificador Axopatch-200A (Axon Instrument Inc, Foster City, CA, Estados Unidos), se filtraron a bajo pase a 1 kHz. Se realizó la digitalización del análisis sin línea usando el programa WCP (J. Dempster, Strathclyde Electrophysiology Software, Glasgow, Reino Unido). Las pipetas de Patch eran de vidrio de borosilicato y pulidas al fuego para tener una resistencia libre de 3-5 MW con una solución interna que contenía 130 mM CsCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM EGTA, 20 mM TEA-Cl, 10 mM D-glucosa, 10 mM Hepes, ajustada de pH hasta 7,3 con CsOH. Las resistencias en serie se mantuvieron a 10 MW. La compensación de capacitancia y resistencias en serie se aplicaron para y se fijaron a, 70%. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. Los resultados se proporcionan como media ± ETM, salvo que indique otra cosa. Se realizó análisis de varianza en los valores de las corrientes y conductancia de membrana, con el ensayo post-hoc Dunn-Bonferroni para la significación de las diferencias observadas entre dos 45 grupos. Se consideró significativo un valor de P de 0,05.

50 **Fluorescencia de triptófano.** Se realizaron medidas de fluoerscencia con un espectrofluorímetro PTI. La longitud de onda de excitación era 295 nm y las anchuras de rendija eran 5 nm y 2,5 nm para excitación y emisión respectivamente. Para cada espectro registrado, la contribución de dispersión se eliminó mediante la resta de un blanco de tampón. Todos los tampones raman contenían tampón 150 mM NaCl, y 20 mM de ácido N-[2-morfolino] etano- sulfónico (MES) al pH deseado. Las muestras se dejaron en incubación durante 1 hora 30 minutos al pH deseado antes de medir el espectro de emisión. Las concentraciones de TNF de tipo salvaje y mutante eran 6 µg/ml.

55 **Preparación de liposomas.** Se prepararon liposomas unilaminares grandes mediante evaporación de fase inversa como la descrita previamente (Vecsey- Semjen *et al.*, 1996). Se prepararon los liposomas de o bien fosfatidilglicerol de huevo al 100% (EPG) o una mezcla de EPC y EPG (1:1 p/p) en un tampón que contiene 100 mM KCl, 20 mM ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etano- sulfónico] (HELPES). pH 7,4 y 1,5 mg/ml de 6-metoxi-N-(3- sulfopropilo) quinolinio (SPQ).

60 **Mediciones de la salida de cloruro.** Todos los experimentos de fluoerscencia se llevaron a cabo usando un espectrofluorímetro PTI equipado con un soporte de celda con termostato (37°C). El tinte se excitó a 350 nm y se registró la emisión a 422 nm, las amplitudes de banda tanto de excitación como de emisión se establecieron a 5 nm. Se diluyeron los liposomas hasta una concentración final de 50 µg/ml en una solución que contenía 100 mM KNO<sub>3</sub> y 20 mM MES pH 6,1 ó 20 mM HEPES, pH 7,4. Se añadieron TNF de tipo salvaje y mutante hasta una concentración final de 3 µg/ml.

65 **Actividad proinflamatoria de los péptidos de TNF y TNF tip.** La actividad proinflamatoria de TNF y péptidos derivados se ensayó usando un bioensayo que mide su capacidad para inducir la regulación hacia arriba de superficie de la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 en el epitelio alveolar de tipo II A549 (Pugin *et al.*, 1996). En resumen,

se sembraron células A549 en confluencia en una placa de microvaloración, y se incubaron con las diversas concentraciones de TNF, mutTNF, y péptidos durante 18 horas a 37°C. La regulación hacia arriba de superficie de ICAM-1 se detectó mediante ELISA directo en células que usan primero un anticuerpo anti-ICAM-1 (R&D systems, Abdington, Reino Unido), un segundo anticuerpo de burro -anti ratón conjugado a IgG-peroxidasa - (Jackson), revelado por o-fenilenediamina (Sigma), y se detuvo mediante H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Se leyeron las densidades ópticas (D. O.) a 490 nm, con la sustracción de las lecturas de D. O. a 620 nm.

## Resultados

10

### Ejemplo 1.1

#### *Efecto de TNF sobre la conductancia en membrane en células murinas*

15 Los presentes inventores primero investigaron si TNF modificaba la corriente de célula enteras en células murinas primarias. Una incubación previa de 30 min de macrófagos peritoneales residentes y células de endotelio microvascular con 100 ng/ml de TNF dio como resultado un incremento significativo de la corriente de salida y, a un grado menor, la de entrada en el caso de células del endotelio microvascular, medida mediante patch clamp de células enteras, cuando se compara con las células no expuestas a TNF(células de endotelio, Fig. 1A; y macrófagos Fig. 2). Una reducción 20 del tiempo de preincubación (hasta 5 min) o en la dosis de TNF (hasta 10 ng/ml) proporcionó resultados similares (datos no mostrados). Este efecto requirió condiciones de preincubación ácidas, ya que no se producía cuando la preincubación se realizaba a pH 7,3 (Fig. 1). La conductancia inducida por TNF era independiente de la tensión y mostró un potencial de inversión de aproximadamente 0 mV en el caso de células de endotelio. Con el fin de investigar 25 si el incremento de la corriente de ion inducida por TNF era dependiente del receptor de TNF, se aislaron macrófagos peritoneales residentes de ratones deficientes tanto el receptor 1 como el 2 de TNF (TNFR1/2<sup>0/0</sup>), y se ensayaron en el ensayo de patch clamp de célula entera. El TNF indujo una corriente dependiente de la tensión en las células que carecen de receptores de TNF (Fig. 2B). Este experimento crítico mostró que la conductancia inducida por TNF en células de mamífero se producía de una manera independiente del receptor de TNF. Estos resultados también indican 30 que la corriente inducida por TNF no es específica del tipo de célula.

30

Ya que el dominio de tipo lecitina de TNF es distinto especial y funcionalmente de sus sitios de unión al receptor, los inventores investigaron a continuación si estaba implicado en el efecto de activación de canal de ion observado de TNF en células de mamíferos. Por lo tanto, el efecto de un mutante de TNF (mutTNF), en el que tres restos críticos para la actividad de tipo lecitina de TNF se reemplazaron por una alanina, se comparó con TNF en células de 35 endotelio. Como se muestra en la Fig. 3, mutTNF carecía completamente del efecto de activación de conductancia de TNF, incluso a una dosis 100 veces mayor (1 µg/ml mutTNF *contra* 10 ng/ml de TNF, datos no mostrados). Por el contrario, las moléculas de TNF nativo y mutante mostraron potenciales similares en la inducción de ICAM-1 en las 40 células de epitelio A549 (Fig. 4). Esto indicó que a pesar de una actividad mediada por el receptor de TNF, mutTNF era incapaz de incrementar la permeabilidad del ion. Con el fin de ensayar la hipótesis de que TNF activaba un canal de sodio, los presentes inventores realizaron experimentos adicionales en la presencia de amilorida, un bloqueador del canal de sodio. Cien µM de amilorida añadidos durante el tratamiento previo a pH 6,0 revocaban el incremento inducido 45 por TNF en la conductancia (Fig. 3).

45

### Ejemplo 1.2

#### *El dominio extremo de TNF media su efecto de incremento de conductancia*

50 Ya que el dominio del extremo de TNF parecía ser crítico para su activación de la permeabilidad de ion, los inventores a continuación ensayaron si un péptido que imita esta región era suficiente para incrementar la conductancia de la membrana, como se observa con TNF nativa. El tratamiento de células del endotelio y macrófagos con el péptido de extremo de 17 aminoácidos (aa) de longitud circularizado (péptido Ltip), que imita el dominio de tipo lectina de TNF, dio como resultado un incremento en las corrientes exterior e interior a pH ácido en el caso de células de endotelio microvascular. Por el contrario que TNF, el efecto persistía a pH neutro, aunque menos pronunciado (Fig. 2A y 4A). 55 De manera similar a TNF, el efecto se bloqueó mediante 100 µM de amilorida (Fig. 4B). Un péptido circularizado mutante (T104A-E106A-E109A) de 17 aa circularizados.

60 17 (péptido mutTip) y un péptido circularizado de 17 aa que contenía el mismo aa que el péptido Ltip en una secuencia al azar (péptido scramblTip) eran inactivos con relación a la actividad de canal de iones (Fig. 4B). Estos resultados indican que el dominio del extremo de TNF era mediar su actividad creciente de la conductancia de membrana, y confirmaba que los restos T104, E106 y E109 eran esenciales para este efecto. El péptido. Ltip también era activo en las células deficientes tanto en los receptores 1 como 2 de TNFR (Fig. 2B). Sin embargo, un hexapéptido de extreme corto que contiene los 3 aa críticos no inducían una corriente dependiente de la tensión en células del endotelio microvascular (datos no mostrados), sugiriendo que este péptido estaba por debajo de la estructura mínima 65 que lleva el efecto del canal de ion. De manera importante, ninguno de los péptidos indujo ICAM - 1 en las células A549, lo que indica que carecía de la actividad mediada por el receptor de TNF.

## ES 2 296 872 T3

### Ejemplo 1.3

#### *TNF nativo y mutado experimentan un despliegue parcial a pH ácido*

5 Se ha mostrado previamente que TNF interactuaba con los lípidos de una manera dependiente de pH y que esta interacción de membrana se correlacionaba con un despliegue parcial de la proteína (Hlodan *et al.*, 1994) (Baldwin *et al.*, 1996). Por tanto los presentes inventores investigaron si la pérdida de actividad de mutTNF en MVEC de pulmón a pH ácido era debido a su incapacidad para experimentar despliegue y que interactúa con membranas. La conformación de mutTNF a diversos valores de pH siguió mediante la medida de la fluorescencia de triptófano intrínseca de la 10 molécula. La intensidad de la fluorescencia cayó tras la acidificación del medio, y la máxima emisión experimentó un desplazamiento de rojo de 318 nm a pH 6 hasta 339 nm a pH 4,6. Estas observaciones indicaron que los restos de triptófano ocultos inicialmente se llegaron a exponer al disolvente. Sin embargo, la proteína no estaba desplegada totalmente ya que el espectro a pH 4,6 no estaba tan desplazado al rojo como mutTNF en 6 M GuHCl. Estos resultados 15 muestran que mutTNF era incapaz de experimentar despliegue ácido. El despliegue ácido de mutTNF era de hecho más rápido y ligeramente más extendido que el TNF de tipo salvaje.

### Ejemplo 1.4

#### *TNF tanto nativo como mutado interactúan con las membranas a pH ácido*

20 Los presentes inventores a continuación investigaron si mutTNF era capaz de interactuar con las membranas a pH ácido siguiendo su capacidad de inducir pérdida de cloruro de los liposomas que contienen el tinte sensible a cloruro SPQ. Estos experimentos se realizaron usando liposomas que contienen fosfatidil glicerol de huevo al 100% (EPG). El TNF nativo indujo salida de cloruro a pH 6,1, MutTNF incluso se plegó a pH 6; los presentes inventores sin embargo mostraron previamente que el pH en la superficie de vesículas de EPG al 100% era mucho menor que la de pH global, y más específicamente que a un pH de 6 global, el pH de la superficie era 4,35. Por lo tanto, mutTNF es probable que experimente un despliegue parcial en la superficie de las vesículas de EPG. El efecto de mutTNF sobre la fluorescencia de SPQ era incluso más pronunciado que el de TNF de tipo salvaje, de acuerdo con el hecho de que el despliegue ácido era más rápido que el del TNF de tipo salvaje. Como se ha observado previamente para TNF nativo (Baldwin *et al.*, 1996), mutTNF no interaccionó con las membranas a pH neutro.

25 Con el fin de investigar si la salida de cloruro era debido a la unión de membrana o inserción de membrana de TNF, los presentes inventores han analizado si los lípidos bromados eran capaces de inactivar la fluorescencia intrínseca de TNF y mutTNF tras la interacción de membrana. Los lípidos bromados han sido útiles en la determinación de la 30 topología de las proteínas de membrana (Bolen *et al.*, 1990) (Markello *et al.*, 1985) así como el estudio de interacción de membrana de toxinas que forman poros (Gonzalez-Manas *et al.*, 1992) (Van der Goot *et al.*, 1991) (Vecsey-Semjen *et al.*, 1997). TNF contiene dos restos de triptófano, uno en la parte superior del dominio de unión del receptor y uno en la parte superior del llamado dominio de extremo. Si el extremo del trímero de TNF se insertaba en la bifase lipídica, la 35 fluorescencia de Trp-113 se debe inactivar tras la inserción en los liposomas compuestos por dioleofosfatidilglicerol que tiene bromos unidos en las posiciones 9 y 10 de las cadenas de acilo. Los presentes inventores de hecho han observado previamente que los triptófanos localizados en la frontera entre los grupos de cabeza de lípido y las cadenas acilo eran susceptibles a la inactivación por bromo. Sin embargo, los presentes inventores eran incapaces de ver 40 cualquier inactivación por fluorescencia cuando se añade o bien TNF o mutTNF a pH ácido a vesículas formadas por lípidos bromados.

45 Las observaciones descritas anteriormente muestran que mutTNF experimenta despliegue parcial a pH ácido y es después capaz de interactuar con las membranas. La pérdida de inactivación por los lípidos de bromación sugiere, sin embargo que la liberación de cloruro era debida a la unión de moléculas de TNF desplegadas parcialmente en lugar de a la inserción de la molécula en la membrana.

50 Los presentes inventores a continuación ensayaron si los péptidos de extremo de TNF eran capaces de inducir la salida de cloruro de las vesículas que contienen SPQ y si la inactivación de triptófano se podría observar tras la interacción con lípidos bromados. Se usaron los liposomas que contienen o bien 100% de lípidos neutros, 100% de 55 lípidos ácidos o una mezcla 1:1 de ambos. Para ninguna de las composiciones de lípidos y para las concentraciones de péptido hasta 300 µg/ml han podido los presentes inventores observar ningún cambio en la fluorescencia de SPQ ni ninguna inactivación por lípidos bromados, y esto con los 4 péptidos. Estos experimentos sugirieron que LTip así como los péptidos modificados eran incapaces de interactuar con las membranas.

### Ejemplo 2

#### *Experimentos de perfusión de pulmón aislado*

60 Se aislaron pulmones de ratas hembra Whistar que pesaban aproximadamente 300 g como se ha descrito por De-Campos *et al.* (1993). Los pulmones se inyectaron por vía intratraqueal con o bien 500 µl de TNF murino de tipo salvaje en 9% NaCl estéril (1 µg/pulmón) o péptido de extremo mTNF (LTip, véase anteriormente; 1 mg/pulmón). Posteriormente los pulmones se perfundieron con sangre aislada de la misma rata. Treinta minutos después, los pul-

mones se inyectaron por vía intratraqueal con 2 ml de solución de 9% de NaCl estéril que conduce a un incremento de peso de aproximadamente 2 g (Fig. 5). Después la evolución del peso se siguió de manera continua durante 150 min (Fig 5).

5 El peso de los pulmones de control (tratados previamente con NaCl) no disminuyó con el tiempo, mientras que, por el contrario, los pulmones que se habían tratado previamente con o bien wt TNF o péptido de extremo mostraron una disminución significativa de peso de 25 a 50% después de 150 min (Fig. 5 y 6) que corresponde a una presencia disminuida de edema hidrostático. En el caso del péptido de extremo de TNF, la pérdida de peso comenzó inmediatamente tras la inyección de los 2 ml de solución de NaCl (Fig. 5).

10 Estos experimentos demuestran que el péptido de extremo de mTNF, como la molécula de tipo salvaje, puede conducir a la resorción de edema. Sin embargo, el péptido de extremo, al contrario que wt mTNF, no interactúa con los receptores de TNF y no conduce a un incremento de expresión de moléculas de adhesión en células del endotelio y del epitelio. Por consiguiente, el péptido de extremo induce menos toxicidad de pulmón comparado con wt mTNF.

15

### Lista de referencias

- 20 **Alexander, H.R. et al (1991):** Single-dose tumor necrosis factor protection against endotoxin-induced shock y tissue injury in rats. *Infect. Immun.* 59, 3889-3894.
- 25 **Atherton, Shepard (1989):** Solid phase peptide synthesis. IRL Press, Oxford.
- 30 **Baldwin, R.L. et al. (1996):** Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion y channel formation. *PNAS USA* 93, 1021-1026.
- 35 **Baldwin R.L., et al. (1996):** Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion y channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 1021-1026.
- 40 **Beutler, B. et al. (1985):** Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229, 869-871.
- 45 **Bolen, E. J. & Holloway, P. W. (1990):** Quenching of tryptophan fluorescence by brominated phospholipid. *Biochemistry* 29, 9638-9643.
- 50 **Bruce, A. J., et al. (1996):** Altered neuronal y microglial responses to excitotoxic y ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors. *Nat Med* 7, 788-794.
- 55 **Deckert-Schluter, M. et al. (1998):** Crucial role of TNF receptor type 1 (p55), but not of TNF receptor type 2 (p 75), in murine toxoplasmosis. *160*, 3427-3436.
- 60 **DeCampos et al. (1993):** Assessment of postpreservation rat lung function using a new model for extended venous reperfusion. *J. Appl. Physiol.* 75, 1890-1896.
- 65 **Echtenacher, B. et al. (1990):** Requirement of endogenous tumor necrosis factor for recovery from experimental peritonitis. *J. Immunol.* 145, 3762-3766.
- 70 **Fields, G. B. & Noble, (1990)** *Int J Pept Protein Res* 35, 161-214.
- 75 **Flynn, J.L. et al. (1995):** TNF is required in the protective immune response against *mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 2, 561-572.
- 80 **Gearing, A.J. et al. (1994):** Processing of TNF precursor by metalloproteinases. *Nature* 370, 555-557.
- 85 **Gonzalez-Manas, J. M. et al. (1992)** *Biochemistry* 31, 7294-7300.
- 90 **Hlodan, R. & Pain, R. H. (1994)** *FEBS Lett* 343, 256-260.
- 95 **Houbenweyl (1974):** Methode der organischen chemie, vol. 15, I & II (ed. Wunch E). Thieme, Stuttgart. IRL Press, Oxford.
- 100 **Jackson, C. J. et al. (1990):** Binding of human endothelium to Ulex europaeus 1-coated Dynabeads: application to the isolation of microvascular endothelium. *J Cell Sci* 96, 257-262. **Kagan, F. et al. (1992):** Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha. *Science* 255, 1427-1430.
- 105 **Lucas, R. et al. (1993):** A role for TNF during African Trypanosomiasis; involvement in parasite control, immunosuppression y pathology. *Res. Immunol* 144, 370-376.

- Lucas, R. *et al.* (1994): Mapping the lectin-like affinity of tumor necrosis factor. *Science* 263, 814-817.
- Lucas, R. *et al.* (1997): Generation of a mouse tumor necrosis factor mutant with anti-peritonitis y desensitisation activities comparable to those of the wild type but with reduced systemic toxicity. *Infect. Immun* 65 (6), 2006-2010.
- 5 Magez, S. *et al.* (1997): Specific update of tumor necrosis factor a is involved in growth control of Trypanosoma brucei. *J. Cel Biol.* 137 (3): 715-727.
- Maniatis T, Fritsch E, Sambrook J (1982). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- 10 Markello, T. *et al.* (1985): Determination of the topography of cytochrome b5 in lipid vesicles by fluorescence quenching. *Biochemistry* 24, 2895-2901.
- 15 Pfeffer, K. *et al.* (1993): Mice deficient for the 55 kD TNF receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to L. monocytogenes infection. *Cell* 73, 457-467.
- 20 Rezaiguia, S. *et al.* (1997): Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by tumor necrosis factor-alpha-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.* 99 (22),325-335. Rothe, J. *et al.* (1993): Mice lacking the TNF receptor 1 are resistant to TNF-mediated toxicity but highly susceptible to infection by Listeria monocytogenes. *Nature* 364, 798-802.
- 25 Steinshamn, S. *et al.* (1996): TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in anti-fungal defense. *J. Immunol.* 157, 2155-2159.
- 30 Vander Goot, G. F. *et al.* (1991): A >molten-globule= membrane-insertion intermediate of the pore-forming domain of colicin A. *Nature* 354, 408-410.
- Vander Poll, T. *et al.* (1997): Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 155, 603-608.
- 35 Vecsey-Semjen, B. *et al.* (1996) *J Biol Chem* 271, 8655-8660.
- Vecsey-Semjen, B. *et al.* (1997) *J Biol Chem* 272, 5709-5717.
- 40 Webb, D.R. y Goeddel D. V., eds (1987): Lymphokines Vol 13, Molecular Cloning y analysis of lymphokines in Lymphokines, A forum for immunoregulatory cell products (Pick E., ed), Academic Press, Inc., London.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

**REIVINDICACIONES**

1. Uso de un péptido derivado de TNF- $\alpha$  que comprende una cadena de 7-17 aminoácidos contiguos **caracterizado** por  
5      por  
- una secuencia de AA que comprende el hexámero TX<sub>1</sub>EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>E en el que X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub> y X<sub>3</sub> puede ser cualquier aminoácido natural o no natural y  
10      - que no tiene actividad de unión al receptor de TNF  
para la preparación de un medicamento para tratar edema.
2. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho hexámero tiene la secuencia TPEGAE.
- 15      3. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2 en el que dicho péptido se **caracteriza** además por comprender una cadena de 7 a 17 aminoácidos contiguos derivados de la región de TNF- $\alpha$  humano de Ser<sup>100</sup> a Glu<sup>116</sup> o de la región de TNF- $\alpha$  de ratón de Ser<sup>99</sup> a Glu<sup>115</sup>.
- 20      4. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 3 en el que dicho péptido comprende una cadena de 11 a 16 aminoácidos contiguos.
- 5      5. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho péptido comprende una cadena de 13 a 15 aminoácidos contiguos.
- 25      6. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho péptido comprende una cadena de 14 aminoácidos contiguos.
- 30      7. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 6, en el que dicha cadena de 14 aminoácidos contiguos se selecciona entre el grupo constituido por las secuencias de aminoácidos contiguos QRETPEGAEAKPWY y PKDT PEGAEELKPWY.
- 35      8. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que dicho péptido es un péptido sintético.
- 40      9. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho péptido es circularizado.
- 45      10. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho péptido es circularizado reemplazando los aminoácidos NH<sub>2</sub>- y COOH-terminal por cisterna, de manera que el puente disulfuro se forma entre las últimas cisteínas.
- 50      11. Uso de un péptido de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dichos péptidos circularizados se eligen entre el grupo constituido por los péptidos circularizados CGQRETPEGAEAKPWYC y CGPKDTPEGAEELKPWYC.
- 55      12. Uso de un péptido de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho edema es edema pulmonar.

50

55

60

65

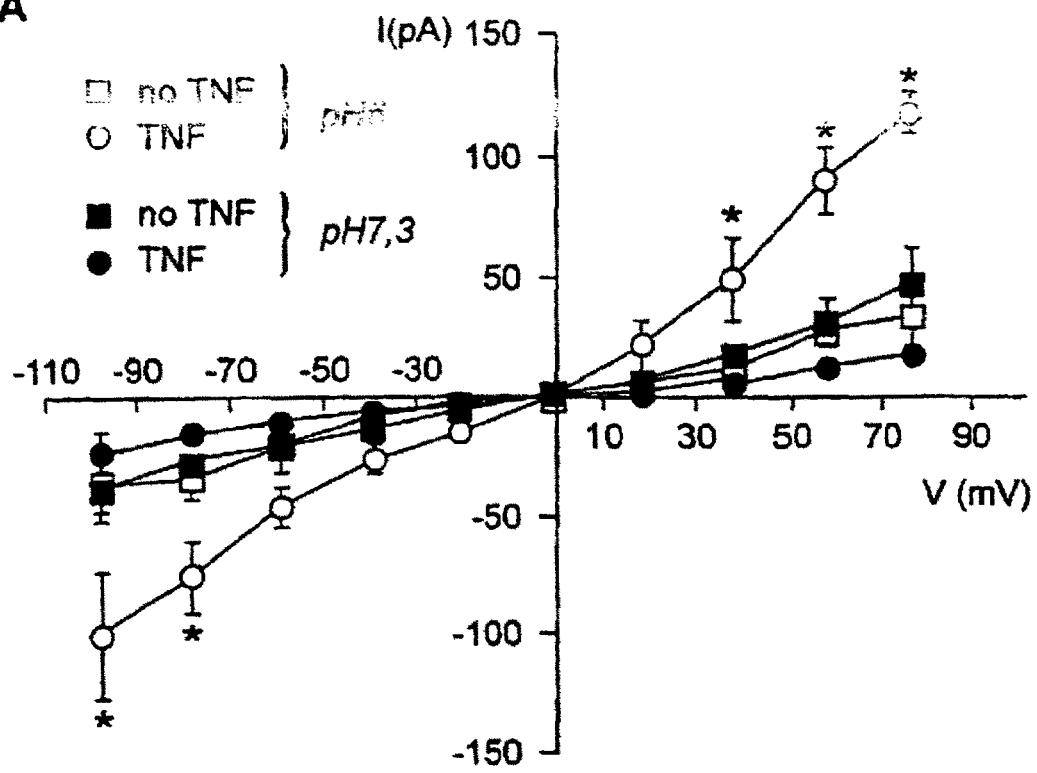
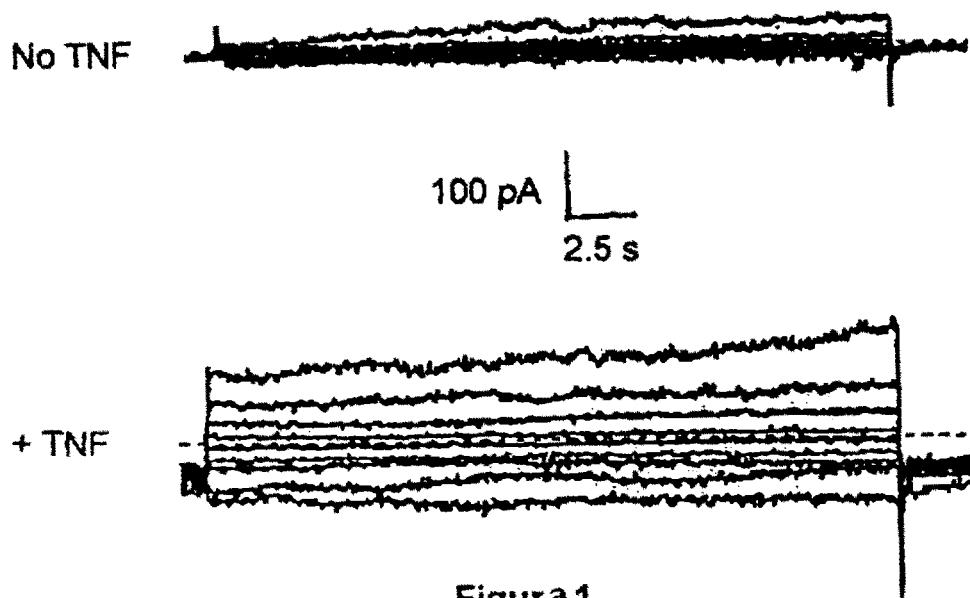
**A****B**

Figura 1

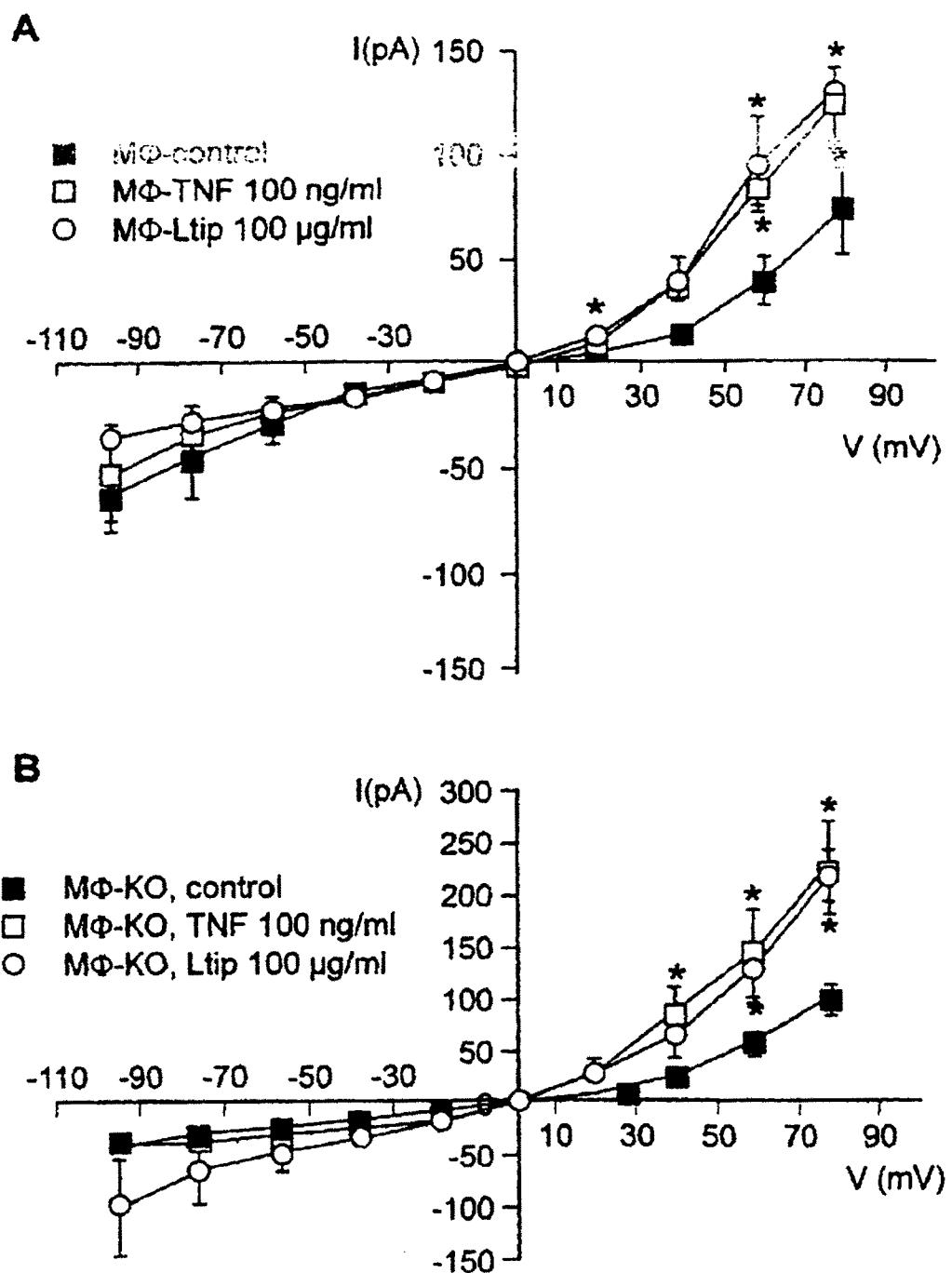


Figura 2

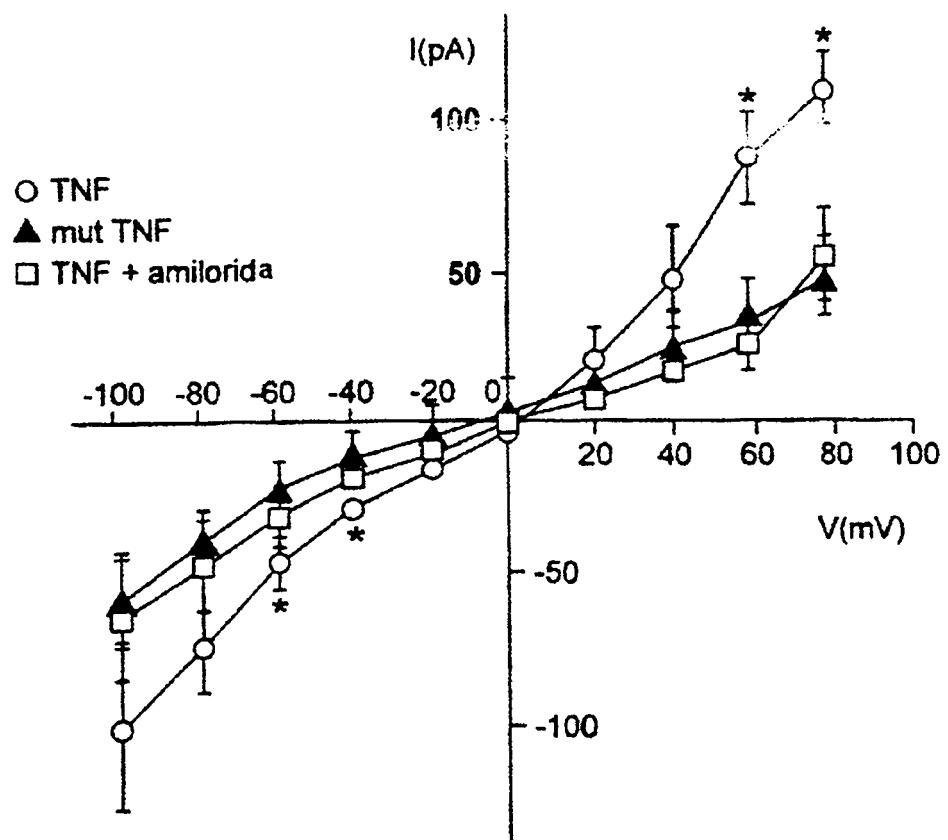


Figura 3

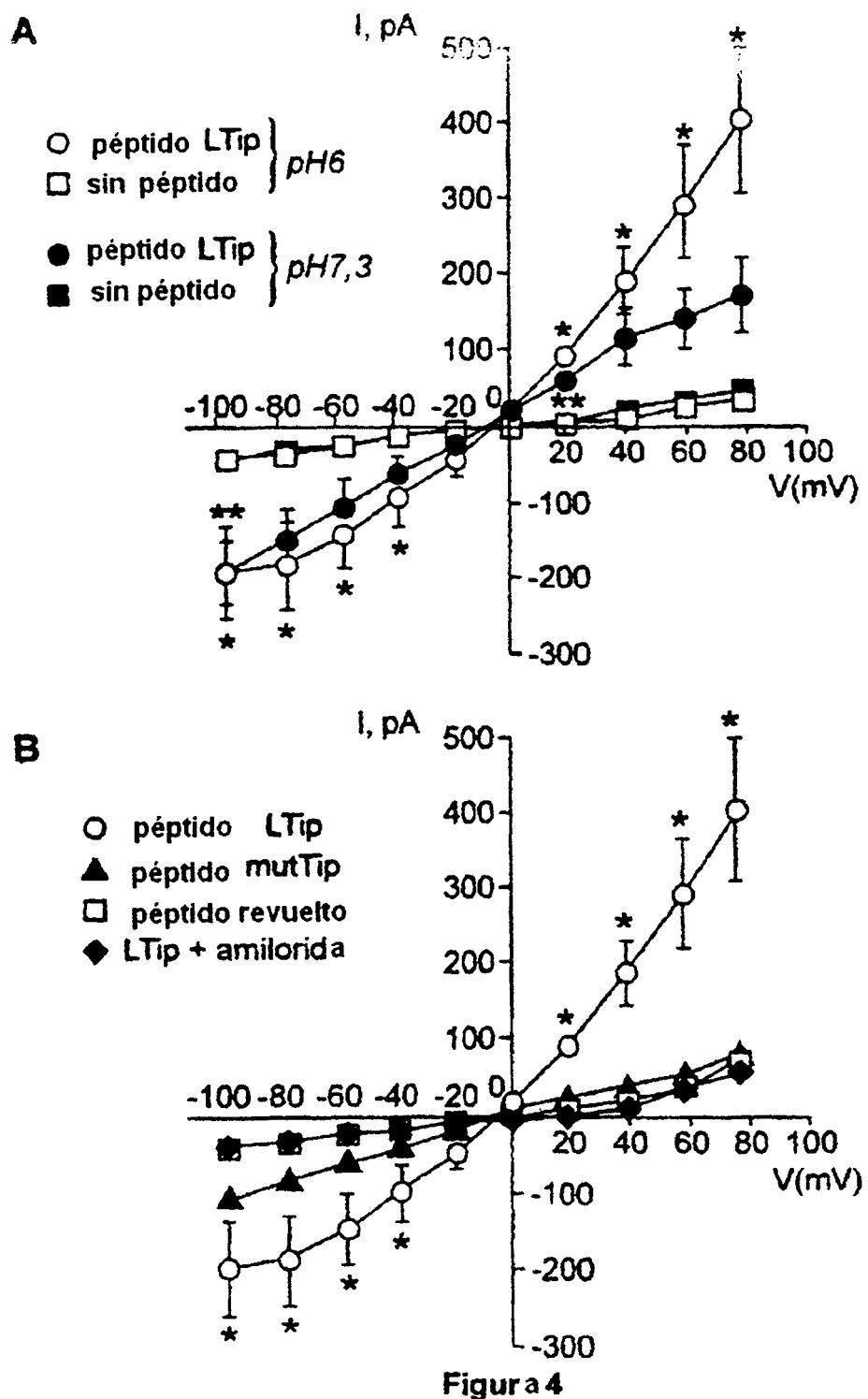


Figura 4

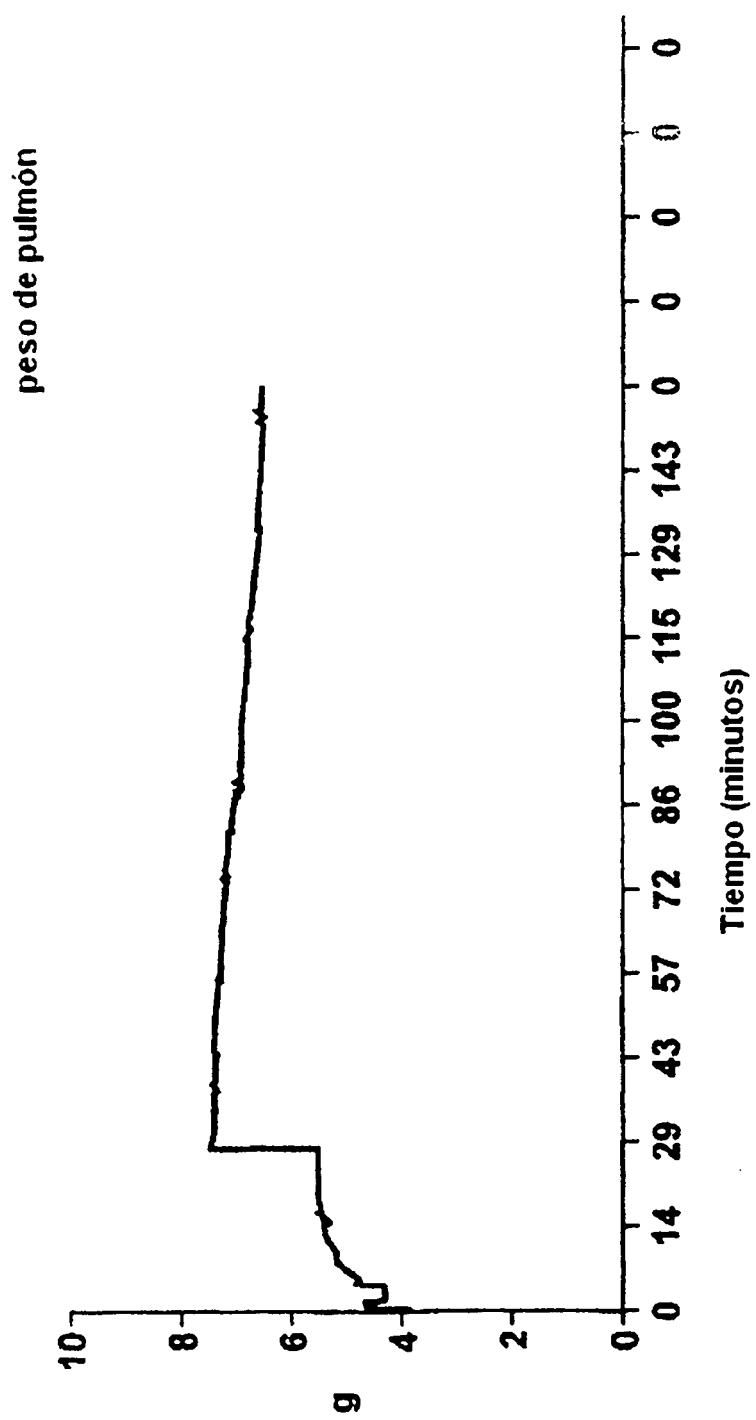


Figura 5

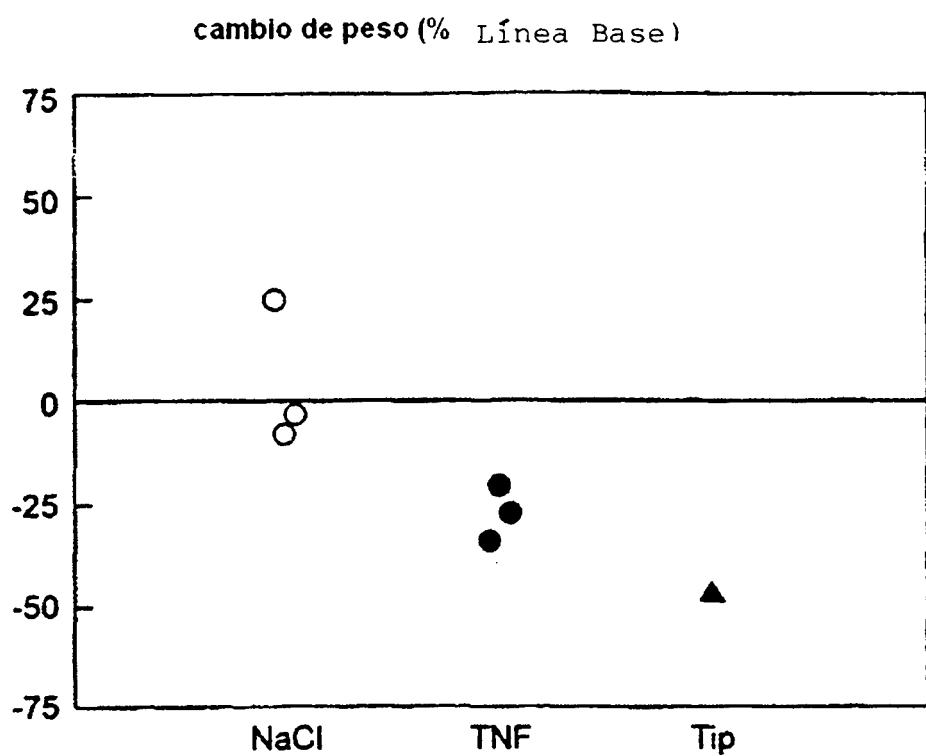


Figura 6

# ES 2 296 872 T3

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Innogenetics N.V.

5 <120> PÉPTIDOS DERIVADOS DE TNF PARA USO EN EL TRATAMIENTO DE EDEMA

<130> 97 EPDiv1

<150> EP98870180.1

<151> 1998-08-14

10 <150> EP98870198.3

<151> 1998-09-18

<150> EP98870222.1

15 <151> 1998-10-21

<160> 10

<170> PatentIn Ver. 3.1

<210> 1

20 <211> 14

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25 <400> 1

Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10

30

<210> 2

<211> 14

<212> PRT

35 <213> *Mus musculus*

<400> 2

40 Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10

<210> 3

45 <211> 6

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <400> 3

Thr Pro Glu Gly Ala Glu  
1 5

55 <210> 4

<211> 17

<212> PRT

60 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

65 Cys Gly Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10 15  
Cys

# ES 2 296 872 T3

<210> 5  
<211> 17  
<212> PRT  
5 <213> *Mus musculus*

<400> 5

10 Cys Gly Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro Trp Tyr  
1 5 10 15  
Cys

15 <210> 6  
<211> 19  
<212> PRT  
20 <213> *Mus musculus*

<400> 6

25 Gly Gly Cys Gly Pro Lys Asp Thr Pro Glu Gly Ala Glu Leu Lys Pro  
1 5 10 15  
Trp Tyr Cys

30 <210> 7  
<211> 19  
<212> PRT  
35 <213> *Mus musculus*

<400> 7

40 Gly Gly Cys Gly Pro Lys Asp Ala Pro Ala Gly Ala Ala Leu Lys Pro  
1 5 10 15  
Trp Tyr Cys

45 <210> 8  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

50 <400> 8

55 Gly Gly Cys Gly Thr Lys Pro Trp Glu Leu Gly Pro Asp Glu Lys Pro  
1 5 10 15  
Ala Tyr Cys

60 <210> 9  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Mus musculus*

# ES 2 296 872 T3

<400> 9

Cys Thr Pro Glu Gly Ala Glu Cys  
1 5

5

<210> 10

<211> 6

10 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC\_FEATURE

15 <222> (2)..(2)

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (4) .. (5)

<223> Xaa representa cualquier aminoácido

25 <400> 10

Thr Xaa Glu Xaa Xaa Glu  
1 5

30

35

40

45

50

55

60

65