



Industria y Comercio  
SUPERINTENDENCIA



00 73886

INVENCIÓN

TRAMITE: 02 EVENTO:01 ACTUACIÓN: 411

REGISTRO Y DEVENIO  
Modificación: 0073886 0073886  
Fecha (UTC): 2000-09-28 17:30:43  
Folios: 111  
Trámite: 02 EVENTOS 2 1 RECEPCION/ 411 PRESENTACION  
Dependencia: 2000 DIVISION DE ALTA GESTION

#### DATOS DEL SOLICITANTE

(71) Nombres y Apellidos o Razón Social

BAYER CORPORATION

Nº de identificación

Representante Legal (Persona Jurídica)

País de Domicilio

Estados Unidos de América

Departamento o Estado

Pennsylvania 15205

Dirección

100 Bayer Road

Ciudad

Pittsburgh

#### (74) DATOS DEL APODERADO

Nombre

EMILIO FERRERO

Dirección y Domicilio

Carrera 4 no 72-35 plso 4o,

Ciudad

BOGOTA COLOMBIA

#### DATOS DEL INVENTOR

(72) Nombre del Inventor (es)

1- Clark PAN

2- Manami TSUTSUMI

3- Armen B SHANAFELT

Identificación

1-. 22342 Princeton Place, Castro Valley, California 94552.

2- 70 Maureen Street, Stratford, Connecticut 06615.

3- 1309 Elmer Drive, Moraga, California 94554.

Estados Unidos de América, respectivamente

Dirección

Ciudad

#### DATOS DE LA PATENTE DE INVENCIÓN

(54) Título de la Invención

**AGONISTAS DEL RECEPTOR 3 (R3) DEL PÉPTIDO ACTIVADOR  
DE LA ADENILATO CICLASA DE LA PITUITARIA Y SUS MÉTODOS  
DE USO FARMACOLÓGICO.**

PRIORIDAD REIVINDICADA

SI ☒ NO ☐

TIPO DE PRIORIDAD

ANDENA ☐

UNIONISTA ☒

(33) País

Fecha

No. Solicitud

US

28 de Septiembre de 1999

# Aún no conocido 09/407,831

US

15 de Junio de 2000

# Aún no conocido 09/595,290

Convención de París

Para Publicar a los ☐ 6 meses

☐ 12 meses

☒ 18 meses a partir de la fecha de la presente solicitud

Colo 09597-801-017-1

(51) CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 38/00

28 SET. 2000

## RESUMEN CON EL OBJETO Y LA FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención presenta novedosos péptidos que funcionan in vivo para estimular la liberación de insulina de las células beta pancreáticas en forma dependiente de la glucosa. Se ha demostrado que estos péptidos secretagogos de insulina estimulan la liberación de insulina en las células de islotes de ratas in vitro e in vivo. Los péptidos de la presente invención proporcionan una nueva terapia para pacientes con secreción de insulina disminuida, en especial diabéticos de tipo 2. En especial, la invención es un péptido seleccionado entre un grupo específico de polipéptidos relacionados con VIP/PACAP, o equivalentes funcionales del mismo. La invención se refiere asimismo a un método para tratar una enfermedad metabólica en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos secretagogos de insulina a dicho mamífero. También se describen métodos para preparar los péptidos, tanto recombinantes como sintéticos.

## ANEXOS DE LA SOLICITUD

- |                                                                                                                            |                                     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Certificado de Existencia y Representación Legal cuando el solicitante sea Persona Jurídica                                | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Los poderes debidamente otorgados, o mención de su protocolización ante la SIC                                             | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Recibo de la tasa respectiva <i>por v/r de \$ 608.000.-</i>                                                                | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Recibo de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación                                                  | <input type="checkbox"/>            |
| Si se reivindica prioridad Andina:                                                                                         |                                     |
| Copia de la primera solicitud                                                                                              | <input type="checkbox"/>            |
| Traducción oficial                                                                                                         | <input type="checkbox"/>            |
| Si se reivindica prioridad Unionista:                                                                                      |                                     |
| Copia certificada de la primera solicitud:                                                                                 | <input type="checkbox"/>            |
| Nota: Debe presentarse dentro de los tres (3) meses, contados a partir de la fecha de radicación de la solicitud posterior |                                     |
| Traducción simple                                                                                                          | <input type="checkbox"/>            |
| Capítulo descriptivo                                                                                                       | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Dibujos, planos necesarios <i>(20 pags)</i>                                                                                | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Capítulo reivindicatorio                                                                                                   | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tarjeta archivo propietarios según formato                                                                                 | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Tarjeta archivo temático según formato                                                                                     | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Extracto para publicación según formato                                                                                    | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Arte final 12 x 12 cms Y 6x6 cms                                                                                           | <input checked="" type="checkbox"/> |
| Otros Documentos                                                                                                           | <input type="checkbox"/>            |

SOLICITO LA CONCESION DE LA PATENTE DE INVENCION Y DECLARO QUE LA INVENCION ES NUEVA Y DE MI PROPIEDAD

FIRMA

*Emilio Ferrero*

NOMBRE EMILIO FERRERO

CC. 438.019 de Usaquén

T.P.No. 31.929

**Agonistas del Receptor 3 (R3) del Péptido Activador de la Adenilato Ciclasa de la Píuitaria y Sus Métodos de Uso Farmacológico**

**Campo de la Invención**

Esta invención se relaciona con polipéptidos recientemente identificados y con el uso de dichos polipéptidos para fines terapéuticos. Más específicamente, los polipéptidos de la presente invención sirven para estimular la liberación de insulina de las células beta del páncreas en forma dependiente de la glucosa, dando así lugar a una opción de tratamiento para los individuos afectados con un desorden metabólico tal como la diabetes o la tolerancia deteriorada a la glucosa, un estado prediabético.

**Antecedentes de la Técnica Relacionada**

La diabetes se caracteriza por el metabolismo de la glucosa menoscabado, que se manifiesta, entre otras cosas, por un nivel de glucosa en sangre elevado en el paciente diabético. Los defectos subyacentes llevan a una clasificación de la diabetes en dos grupos principales: la diabetes tipo 1, o diabetes mellitus insulín dependiente (IDDM) que surge cuando los pacientes carecen de células beta productoras de insulina en sus glándulas pancreáticas, y diabetes mellitus tipo 2, o diabetes mellitus no insulín dependiente (NIDDM), que se produce en pacientes con función deteriorada de las células beta y alteraciones en la acción de la insulina.

Actualmente los pacientes con diabetes tipo 1 son tratados con insulina, en tanto que la mayoría de los pacientes diabéticos tipo 2 son tratados con agentes que estimulan la función de las células beta o con agentes que intensifican la sensibilidad de los tejidos de los pacientes hacia la insulina. Con el tiempo, casi la mitad de los pacientes diabéticos tipo 2 pierden su respuesta a estos agentes y luego deben recibir terapia insulínica. Los fármacos utilizados en la actualidad para tratar la Diabetes tipo 2 incluyen:

C. 205.504  
M. B.

Inhibidores de la glucosidasa (PRECOSE, VOGLIBOSE y MIGLITOL (denominaciones comerciales). Los inhibidores de la glucosidasa reducen la salida de la glucosa postprandial retardando la absorción de la glucosa del intestino. Estos fármacos son seguros y brindan tratamiento para sujetos diabéticos leve a moderadamente afectados. Sin embargo, en la bibliografía se han dado a efectos colaterales gastrointestinales.

Sensibilizadores a la insulina: Los sensibilizadores a la insulina son fármacos que intensifican la respuesta del cuerpo a la insulina. Las tiazolidinodionas tales como (REZULIN (denominación comercial, troglitazona) activa el receptor gamma de PPAR y modula la actividad de una serie de genes que no han sido descritos en detalle. A pesar de ser eficaces, estos fármacos han sido asociados con toxicidad hepática. A causa de la hepatotoxicidad, REZULIN ha sido retirado del mercado.

Secretagogos de insulina: (las sulfonilureas y otros agentes que actúan por el canal del K<sup>+</sup> dependiente de ATP. Las SFU constituyen la terapia standard para los diabéticos de tipo 2 que tienen glucemia leve a moderada en ayunas. Las SFU tienen limitaciones que incluyen un potencial de inducir hipoglucemia, de aumento de peso y de altos índices de fracaso primario y secundario. De 10 a 20 % de los pacientes tratados inicialmente no llega a demostrar un efecto significativo del tratamiento (fracaso primario). El fracaso secundario queda demostrado por una pérdida adicional de 20 – 30 % del efecto del tratamiento al cabo de seis meses tomando SFU. El tratamiento con insulina es necesario en 50 % de los pacientes que responden a la SFU tras 5 – 7 años de terapia (Scheen, A.J. y otros, Diabetes Res. Clin. Pract. 6: 533 – 543 (1989)).

GLUCOPHAGE (denominación comercial, metformina HCl) es una biguanida que reduce la glucosa en sangre disminuyendo la producción

hepática de glucosa e incrementando la absorción y el aprovechamiento periférico de glucosa. El fármaco es eficaz para reducir la glucosa en sangre en sujetos leve a moderadamente afectados y no tiene los efectos secundarios de aumento de peso ni el potencial de inducir hipoglucemia. Sin embargo, GLUCOPHAGE tiene un número de efectos secundarios que incluyen trastornos gastrointestinales y acidosis láctica. GLUCOPHAGE está contraindicado en diabéticos de más de 70 años de edad y en sujetos con deterioro de la función renal o hepática. Por último, GLUCOPHAGE tiene los mismos índices de fracaso primario y secundario que las SFU.

El tratamiento con insulina se instituye una vez que la dieta, el ejercicio y las medicaciones orales han fallado en el control adecuado de la glucosa en sangre.

A causa de los problemas presentados por los tratamientos actuales, se necesitan nuevos tratamientos para retener la secreción normal (dependiente de la glucosa) de insulina. Esas nuevas drogas deben tener las siguientes características: son dependientes de la glucosa para promover la secreción de insulina, es decir, sólo producen secreción de insulina en presencia de un elevado nivel de glucosa en sangre; tienen bajos índices de fracaso primario y secundario y conservan la función celular de los islotes. La estrategia para desarrollar la nueva terapia descrita en la presente se basa en el mecanismo de señalamiento de adenosina monofosfato cíclica (cAMP) y sus efectos sobre la secreción de insulina.

La AMP cíclica es un regulador importante del proceso de secreción de insulina. La elevación de esta molécula de señalamiento promueve el cierre de los canales de  $K^+$  tras la activación de la ruta de la proteína cinasa A. El cierre de los canales de  $K^+$  provoca la despolarización celular y la posterior apertura de los canales de  $Ca^{++}$ , lo que a su vez conduce a la exocitosis de los

gránulos de insulina. Se producen pocos, si algún efecto sobre la secreción de insulina en ausencia de bajas concentraciones de glucosa (Weinhaus A, y otros, Diabetes 47: 1426 – 1435 (1998)). Los secretagogos como el péptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria ("PACAP") y GLP-1 utilizan el sistema cAMP para regular la secreción de insulina en forma dependiente de la glucosa (Komatsu M, y otros, Diabetes 46: 1928 – 1938 (1997)).

PACAP es un potente simulador de la secreción de insulina dependiente de la glucosa por las células beta pancreáticas. Se han descrito tres tipos de receptores de PACAP diferentes (R1, R2 y R3) (Harmar, A y otros *Pharmacol. Reviews*. 50: 265 – 370 (1998)). El PACAP no exhibe selectividades por los receptores, ya que tiene actividades y potencias comparables en los tres receptores. R1 está situado predominantemente en el SNC, en tanto que R2 y R3 están distribuidos con más amplitud. R2 está situado en el SNC así como el hígado, los pulmones y el intestino. R3 está situado en el SNC, el páncreas, el músculo esquelético, el corazón, el riñón, el tejido adiposo, los testículos y el estómago. El reciente trabajo esgrime que R3 es responsable de la secreción de insulina por las células beta (Inagaki, N y otros, *PNAS* 91: 2679 – 2683, (1994)). Esta acción insulínica del PACAP es mediada por la proteína de unión de GTP, Gs. La acumulación de cAMP intracelular, activa a su vez los canales de cationes no selectivos de las células beta que aumentan el  $[Ca^{++}]$  y promueve la exocitosis de los gránulos secretorios que contienen insulina.

PACAP es el miembro más reciente de la superfamilia de las hormonas peptídicas metabólicas, neuroendocrinas y neurotransmisoras que ejercen su acción a través de la ruta de transducción de señales mediada por cAMP (Arimura, Regul. Peptides 37: 287 – 303 (1992)). Los péptidos biológicamente activos son liberados por el precursor biosintético en dos formas moleculares, ya sea como péptido de 28 aminoácidos (PACAP-38) y/o como péptido de 27

aminoácidos (PACAP-27) con un término carboxilo amidado (Arimura, ya mencionado).

Las concentraciones más elevadas de ambas formas del péptido se encuentran en el cerebro y en los testículos (reseñado por Arimura, ya mencionado). La forma más corta del péptido, PACAP-27, exhibe 68 % de homología estructural con el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Sin embargo, la distribución de PACAP y VIP en el sistema nervioso central sugiere que estos péptidos estructuralmente relacionados tienen funciones neurotransmisoras diferenciadas (Koves y otros, Neuroendocrinology 54: 159 – 169 (1991)).

Los recientes estudios han demostrado diversos efectos biológicos del PACAP-38, desde un rol en la reproducción (McArdle, Endocrinology 135: 815 – 817 (1994)) a la capacidad de estimular la secreción de insulina (Yada y otros, J. Biol. Chem. 129: 1290 – 1293 (1994)).

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un péptido de 28 aminoácidos que fue aislado por primera vez del intestino delgado superior del cerdo (Said y Mutt, Science 169: 1217 – 1218, 1970, patente de los Estados Unidos No. 3.879.371). Este péptido pertenece a una familia de pequeños polipéptidos estructuralmente relacionados e incluye la helodermina, secretina, las somatostatinas y el glucagón. Los efectos biológicos del VIP son mediados por la activación de las proteínas receptoras unidas a la membrana que están acopladas con el sistema de señalamiento de cAMP intracelular. Estos receptores se conocían originalmente como VIP-R1 y VIP-R2. Sin embargo, más tarde se encontró que eran los mismos receptores que PACAP-32 y PACAP-R3. El VIP despliega actividades y potencias comparables en PACAP-32 y PACAP-R3.

A fin de mejorar la estabilidad del VIP en fluido pulmonar humano, Bolin y otros (Biopolymers 37: 57 – 66 (1995) prepararon una serie de variantes de VIP destinadas a aumentar la inclinación helicoidal de este péptido y reducir la degradación proteolítica. Se enfocaron sustituciones en las posiciones 17 y 25 – 28, que se consideraban sin importancia para la unión a los receptores. Más aun, la secuencia "CGT" fue marcada sobre el término C de las muteínas VIP con la esperanza de formar casquete sobre la hélice con más efectividad. Por último, para estabilizar la hélice de manera más efectiva, se sintetizaron varias variantes cíclicas (patente de los Estados Unidos No. 5.677.419). Si bien estos esfuerzos no estaban dirigidos hacia la selectividad por los receptores, produjeron dos análogos (en la presente denominados R3P0 y R3P4) que tienen una selectividad superior a 100 veces la de PACAP-R3 (Gouriet y otros, Peptides 18: 403 – 408, (1997); Xia y otros, J. Pharmacol. Exp. Ther. 281: 629 – 633 (1997)).

GLP-1 es liberado de la célula L intestinal después de una comida y funciona como hormona incretina (es decir, potencia la liberación de insulina inducida por la glucosa de la célula beta del páncreas). Es un péptido de 37 aminoácidos expresado de manera diferencial por el gen Glucagón, dependiendo del tipo de tejido. Con GLP-1 se han recogido datos clínicos que respaldan el efecto benéfico de elevar los niveles de cAMP en las células  $\beta$ . Infusiones de GLP-1 en diabéticos tipo 2 mal controlados normalizaba sus niveles de glucosa en sangre en ayunas (Gutniak, M y otros, New Eng. J. Med. 326: 1316 – 1322 (1992)) y con infusiones más prolongadas se mejoraba la función de las células beta hasta alcanzar los de sujetos normales (Rachman, J y otros, Diabetes 45: 1524 – 1530 (1996)). Un informe reciente ha demostrado que GLP-1 mejora la capacidad de las células  $\beta$  para responder a la glucosa en sujetos con tolerancia a la glucosa deteriorada (Byrne y otros, Diabetes 48:

1259 - 1265 (1998)). Sin embargo, todos estos efectos son efímeros a causa de la corta vida media del péptido. Recientemente, Novo Nordisk ha interrumpido las pruebas clínicas con GLP-1. Este fracaso se debió, según se informa, a una vida media plasmática muy breve del péptido, de pocos minutos.

EXENDIN 4 (denominación comercial). Amylin Pharmaceuticals está llevando a cabo pruebas en Fase I con EXENDIN 4 (AC2993), un péptido de 39 aminoácidos identificado originariamente en Gila Monster. Los estudios en Fase II han comenzado recientemente. Amylin invoca resultados preclínicos que exhiben una eficacia de 4 horas de duración y eficacia en modelos animales cuando se administra AC2993 por vía subcutánea, oral y nasal. No obstante, en dosis de 0,2 y 0,3  $\mu\text{g/kg}$ , la incidencia de cefaleas, hipotensión postural, náuseas y vómitos fue considerable.

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

#### SÍNTESIS DE LA INVENCIÓN

La invención presenta novedosos polipéptidos que funcionan in vivo como agonistas del receptor R3 de PACAP (en adelante, denominado R3) y que son eficaces en el tratamiento de enfermedades y trastornos que pueden ser mejorados por agentes con actividad agonista de R3. De preferencia, los polipéptidos de la presente invención son agonistas de R3 selectivos, con mayor potencia en R3 que en R2 y R1. Por ejemplo, aunque no a manera de limitación, estos polipéptidos estimulan la liberación de insulina de las células beta del páncreas en forma dependiente de la glucosa y la posterior reducción de glucosa plasmática. Se ha demostrado que estos polipéptidos secretagogos de insulina estimulan la liberación de insulina en las células de los islotes de ratas y humanas in vitro e in vivo. A diferencia del PACAP-27, estos

polipéptidos secretagogos también reducen la glucosa sanguínea en vivo más que el vehículo control tras el desafío con glucosa.

Los polipéptidos de la presente invención aportan una nueva terapia para pacientes con, por ejemplo, trastornos metabólicos como los producidos por la secreción endógena disminuida de insulina, en especial diabéticos de tipo 2, o para pacientes con tolerancia a la glucosa deteriorada, un estado prediabético que tiene una leve alteración de la secreción de insulina.

Específicamente, un aspecto de la presente invención reside en un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC. ID NOS: 11 a 14, SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NOS: 21 a 26, SEC. ID. NOS 32 a 36, SEC. ID. NOS: 40 a 53, SEC. ID. NO: SEC. ID. NOS: 57 a 61, SEC. ID. NOS: 63 a 99, SEC. ID. NOS: 102 a 119, SEC. ID. NOS: 121 a 137, SEC. ID. NOS: 139 a 177, SEC. ID. NOS: 179, 180, SEC. ID. NOS: 183 a 202, SEC. ID. NOS: 322 a 341 y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que demuestran por lo menos una función biológica sustancialmente igual a la de los polipéptidos de las SEC. ID NOS enumeradas (colectivamente, "polipéptidos de la presente invención"), incluyendo los equivalentes funcionales de los mismos. Una realización preferida de la presente invención consiste en un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC. ID. NOS: 12, 18, 21 – 26, 32 – 35, 41, 43 – 53, 63, 66, 70 – 92, 94 – 99, 102 – 104, 107, 109, 112 – 119, 121 – 137, 139, 140, 142 – 153, 156 – 174, 187, 322 a 314 y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que demuestran por lo menos una función biológica sustancialmente igual a la de los polipéptidos de las SEC. ID NOS enumeradas. Una realización más preferida reside en un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en las SEC. ID. NOS: 18, 24, 25, 32, 33, 43 – 50, 52, 53, 70 – 87, 92, 98, 99, 104, 107, 112 – 114, 129 – 131, 137, 140, 144, 147 – 151, 156 – 159 y 161 – 173, 323, 324, 326, 327, 335, 338, 341

y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que demuestran por lo menos una función biológica sustancialmente igual a la de los polipéptidos de las SEC. ID NOs enumeradas. Una realización muy preferida de la presente invención es un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en las SEC. ID. NOs: 18, 32, 43, 45, 47, 50, 52, 71, 72, 83, 86 y 87 y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que demuestran por lo menos una función biológica sustancialmente igual a la de los polipéptidos de las SEC. ID NOs enumeradas.

Otra realización de la presente invención es un polinucleótido que codifica para los polipéptidos de la presente invención y los consiguientes vectores y células huésped que expresan en forma recombinante los polipéptidos de la presente invención. Estas secuencias polinucleotídicas incluyen las identificadas como SEC. ID. NOs: 204, 207 – 211, 214 – 230 y 232 – 321. Los polinucleótidos preferidos incluyen los identificados como SEC. ID. NOs: 204, 207 – 209, 215, 217 – 230, 232 – 234, 237, 239, 242 – 268, 270 – 281 y 284 – 321. Los polinucleótidos más preferidos incluyen los identificados como SEC. ID. NOs: 207, 218 – 2224, 226 – 230, 234, 237, 242 – 244, 258 – 260, 266, 268, 272, 275 – 279, 284 – 287, 289 – 301, así como 303, 304, 306, 307, 318 y 321. Los polinucleótidos muy preferidos incluyen los identificados como SEC. ID. NOs: 217, 221 y 226.

También se presentan anticuerpos y fragmentos de anticuerpos que se unen selectivamente a los polipéptidos de la presente invención. Dichos anticuerpos son útiles para detectar los polipéptidos de la presente invención, y los puede identificar y preparar por procedimientos muy conocidos en la técnica, incluyendo los análogos al descripto más adelante en el Ejemplo 17.

La invención se refiere asimismo a un método para tratar la diabetes y/u otras dolencias y trastornos afectados por los polipéptidos de la presente

invención, preferentemente afectados por la función agonista del R3 de los polipéptidos de la presente invención en un mamífero, método que incluye la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de cualquiera de los polipéptidos de la presente invención o cualquier polipéptido activo en R3 como los de SEC. ID. NO: 5 y 9.

También se describen métodos para preparar los polipéptidos de la presente invención, tanto recombinantes como sintéticos.

#### **BREVE DESCRIPCIÓN DEL DIBUJO**

La Figura 1 ilustra secuencias de aminoácidos de polipéptidos de SEC. ID. NO: 11 a 14 inclusive, SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NOs: 21 a 26, SEC. ID. NO: SEC. ID. NOs 32 a 36, SEC. ID. NOs: 40 a 53, SEC. ID. NOs 57 a 61, SEC. ID. NOs 63 a 99, SEC. ID. NOs: 102 a 119, SEC. ID. NOs: 121 a 137, SEC. ID. NOs: 139 a 177, SEC. ID. NOs: 179, 180, SEC. ID. NOs: 183 a 202, y SEC. ID. NOs: 322 a 341, que constituyen los polipéptidos reivindicados.

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

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

Las Figuras 4A – 4B son gráficos que ilustran los efectos de GLP-1 o R3P3 sobre la liberación de insulina de los islotes de rata in vitro.

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

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

La Figura 7 es un gráfico de barras que demuestra que una dosis de 1 nmo/kg de R3P3, R3P12, R3P13 o GLP-1 aumentan la eliminación de glucosa en la rata por la vía subcutánea de administración.

La Figura 8 ilustra las secuencias polinucleotídicas SEC. ID. NOs: 54 a 56 y 203 a 301, que codifican para los polipéptidos de la presente invención.

Los primeros 6 nucleótidos representan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Bam HI seguido por los siguientes 12 nucleótidos que codifican el sitio de reconocimiento del Factor Xa "IEGR". Los últimos 6 nucleótidos representan el sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Xho I o Eco RI precedido por los 6 nucleótidos que codifican los dos codones de terminación. Los nucleótidos entre el sitio del Factor Xa y los codones de terminación codifican la secuencia de aminoácidos del correspondiente polipéptido. Los nucleótidos situados entre los dos sitios de restricciones son clonados en los sitios de restricción correspondientes del vector pGEX-6P.1 (Amersham Pharmacia Biotech.) Las SEC. ID. NOs: están indicadas entre paréntesis.

La Figura 9 ilustra el efecto de PACAP-27, VIP y los agonistas selectivos del receptor sobre la frecuencia cardíaca en perros concientes (ver Ejemplo 15).

La Figura 10 ilustra la detección de R3P66 por anticuerpos policlonales producidos en conejos inmunizados con la secuencia C-terminal de R3P66 (Ac-CRK1VAAKKYLQSIKNKRY-COOH) empleando ELISA.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Esta invención presenta novedosos polipéptidos, así como fragmentos, derivados y variantes de los mismos, que demuestran por lo menos una función biológica sustancialmente igual a la de los polipéptidos de la Fig. 1 (colectivamente denominados polipéptidos de la presente invención). Los polipéptidos de la presente invención funcionan in vivo como agonistas de R3 o, por otro lado, en la prevención y/o tratamiento de enfermedades o trastornos tales como diabetes, asma, hipertensión, problemas masculinos para la reproducción, incluyendo la motilidad del espermatozoides humano, enfermedades cardiovasculares, úlceras y demás trastornos identificados en la presente o que, de lo contrario, funcionan de acuerdo con lo descrito más adelante. De preferencia, los polipéptidos de la presente invención estimulan la liberación de insulina de las células beta pancreáticas en forma dependiente de la glucosa.

Los polipéptidos de la presente invención son agonistas de R3. De preferencia, son agonistas de R3 selectivos, con por lo menos una selectividad de 10 veces por R3 con respecto a R2 y/o R1. Más preferentemente, son agonistas de R3 con al menos una selectividad de 100 veces por R3 con respecto a R2 y/o R1. Muy preferentemente, simulan la liberación de insulina en el plasma de modo dependiente de la glucosa sin inducir estasis o aumentar el nivel de glucosa en plasma que es contraproducente para el tratamiento, por ejemplo, de la diabetes tipo 2. Además, es preferible que los polipéptidos de la presente invención sean agonistas selectivos del receptor R3, para provocar así, por ejemplo, un aumento de la liberación de insulina en el plasma, y al mismo tiempo siendo selectivos contra otros receptores responsables de efectos secundarios adversos o peligrosos como retención de agua gastrointestinal y/o efectos cardiovasculares adversos tales como frecuencia cardíaca aumentada. Últimamente se ha descubierto que la secreción de insulina mediada por R3 no provoca hipoglucemia; la activación de R2 conduce

a la liberación de glucosa en plasma, lo que es contraproducente para la diabetes del tipo 2, y retención de agua gastrointestinal y la activación de R1 lleva a efectos cardiovasculares como frecuencia cardíaca aumentada.

Los polipéptidos de la presente invención aportan una nueva terapia con secreción de insulina endógena disminuida o tolerancia a la glucosa deteriorada, en especial con diabetes tipo 2.

A. Explicación

PACAP, VIP, GLP-1 y EXENDIN-4 son polipéptidos capaces de estimular la liberación de insulina en forma dependiente de la glucosa. Sin embargo, este hecho por sí solo no garantiza la reducción de la glucosa in vivo. Dado que se sabe que PACAP se une a los receptores PACAP-R1,-R2 y -R3, y que se sabe que VIP se une a los receptores PACAP-R2 y -R3, se pensó que podrían tener características estructurales similares. La alineación por apilamiento expuesta a continuación demuestra las relaciones estructurales primarias:

|           |                                                             |    | SEC | ID NO |
|-----------|-------------------------------------------------------------|----|-----|-------|
| VIP       | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK RYLNSILN-NH <sub>2</sub>            | 28 | 1   |       |
| PACAP38   | 1 HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVLGR YKQRVKVK-NH <sub>2</sub> | 38 | 2   |       |
| GLP-1     | 1 HAEGTFTSDV SSYLEGQAAK EFLAWLVKGR-NH <sub>2</sub>          | 30 | 3   |       |
| Exendin 4 | 1 HEGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS-NH <sub>2</sub> | 39 | 4   |       |

(donde se pueden encontrar las abreviaturas de una sola letra para los aminoácidos en Zubay, Biochemistry 2a. Edic. 1988, MacMillan Publishing, Nueva York, pág. 33) y se las define más adelante. Los polipéptidos de la presente invención (Fig. 1) están muy estrechamente relacionados con VIP en términos de su estructura primaria, con la excepción de SEC. ID. NO: 57 - 61, 66 - 99 y 176, 177, 179, 180, 183 - 202, que están estrechamente relacionados con PACAP.

Los inventores de la presente han creado un nuevo polipéptido que es un agonista de R3, preferentemente un agonista selectivo de R3 y/o que exhibe un efecto secretagogo selectivo de insulina dependiente de la glucosa donde la activación selectiva del receptor PACAP R3 lleva por cierto a una ruta dependiente de la glucosa a la secreción de insulina por las células beta del páncreas, con la concomitante reducción de la glucosa in vivo. En vista de ello, estudiaron en primer lugar las estructuras de PACAP-27 y VIP en un esfuerzo por determinar los residuos más probablemente responsables de la selectividad por el receptor. Se sabe que PACAP y VIP no reducen la glucosa in vivo sino que, por el contrario, estimulan la liberación de glucosa del hígado. Se ha demostrado que la activación de R2 aumenta los niveles plasmáticos de glucosa in vivo. Antes, tanto PACAP como VIP habían sido sometidos extensamente a mutagénesis por diversas razones. Por ejemplo, las deleciones en serie de PACAP27 y PACAP 38 de ambos extremos confirmaron la importancia de ambos términos para la unión a los receptores (Gourlet y otros, Eur. J. Pharm. 287, 7 – 11 (1995); Gourlet y otros, Regul Peptides 62: 125 – 130 (1996)). Las actividades de unión a la membrana de cerebros de rata y de adenilato ciclasa de las muteínas híbridas PACAP27/MIP implicaron la importancia de los residuos N-terminales de PACAP para el reconocimiento de PACAP-R1 (Ando y otros, Biomed. Pept. Proteins Nucleic Acids 2: 41 – 46 (1996)). El aumento de la basicidad de Leu<sup>17</sup>-PACAP27 y Leu<sup>17</sup>-VIP por medio de la preparación de las mutaciones K15R, K20R y K21R y la extensión del término C con la secuencia "GKR" dieron origen a un aumento de la duración de la actividad relajante de la tráquea del conejillo de Indias debida, según se sugiere, a la protección de la unión de heparina (Kashimoto y otros, Ann NY Acad. Sci. 805: 505 – 510 (1996)). Gourlet y otros (Biochim. biophys Acta 1314: 267 – 273 (1996)) demostraron que la muteína Q16R de VIP y PACAP poseía

mayores afinidades que sus polipéptidos nativos respectivos por PACAP-R2 Y R1 respectivamente. Gourlet y otros (Peptides 18: 1539 – 1545, (1997)) desarrollaron un agonista de alta afinidad selectivo de R2 preparando un péptido quimérico sustituido [K15, R16, L27] VIP(1-7)/GRF(8-27). La acilación N-terminal y la sustitución D-Phe2 de este agonista selectivo dio origen a un potente antagonista selectivo de R2 (Gourlet y otros (Peptides 18: 1555 – 1560, (1997)). Las muteínas de VIP Y22L y Y22A, pero no Y22F, exhiben menor afinidad por PACAP-R3, lo que sugiere la importancia de un grupo aromático en la posición 22 para la unión al receptor R3, pero no para la unión al receptor R2 (Gourlet, Eur. J. Biochem 348: 95 – 99 (1998)). Helodermina y helospectina, péptidos tipo VIP aislados del veneno de las glándulas salivales de lagartijas exhiben una selectividad por PACAP R3 de ~R3 (Gourlet, Ann. NY Acad. Sci 865: 247 – 252 (1998)). El marcaje de fotoafinidad de PACAP27 por el reemplazo de F6 y Y22 con p-benzoil-L-fenilalanina (pBz) o K15, K20 y K21 con pBz<sub>2</sub> sugirió que K15 y F22 están más cerca de PACAP-R1 que F6, K20 y K21 (Cao y otros, Eur. J. Biochem 244: 400 – 406, (1997); Cao y otros, Ann NY Acad. Sci. 865: 82 – 91 (1998)).

Los inventores de la presente han encontrado varios polipéptidos que provocan la estimulación de la liberación de insulina en forma dependiente de la glucosa y provocan la reducción de la glucosa in vivo. Esos polipéptidos tienen cierta similitud con VIP y PACAP. En especial, un alineación apilada ilustra lo siguiente

|         |                                                             |       | SEC. |
|---------|-------------------------------------------------------------|-------|------|
|         |                                                             | ID NO |      |
| VIP     | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQMAVK KYLNSILN-NH <sub>2</sub>            | 28    | 1    |
| PACAP38 | 1 HSDGIFTDSY SRYRKQMAVK KYLA AVLGR YKORVKNK-NH <sub>2</sub> | 38    | 2    |
| R3P1    | Ac-HSDAVFTENY TKLRKQLAAK KYLNDLKKGG T-NH <sub>2</sub>       | 31    | 6    |
| R3P3    | 1 HSDAVFTENY TKLRKQLAAK KYLNDLKKGG T                        | 31    | 8    |
| R3P12   | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKKGG T                        | 31    | 15   |
| R3P13   | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKK-NH <sub>2</sub>            | 28    | 16   |
| R3P36   | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQLAAK KYLNDIKKKR Y                        | 31    | 32   |
| R3P66   | 1 HSDAVFTDNY TRLRKQVAAK KYLQSIKKNR Y                        | 31    | 72   |

Sin embargo, no hay indicación en la literatura científica ni de patentes que sugiera que las modificaciones selectas a las secuencias VIP y PACAP den origen a un polipéptido con capacidad de estimular la secreción de insulina en forma dependiente de la glucosa y reducen la concentración de glucosa en plasma.

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

El término " polinucleótido que codifica un polipéptido" abarca un polinucleótido que incluye sólo una secuencia codificadora para el polipéptido, así como un polinucleótido que incluye otras secuencias codificadoras y/o no codificadoras. La presente invención se relaciona asimismo con polinucleótidos que se hibridan a las secuencias antes descritas si hay por lo menos aproximadamente 70 %, preferentemente por lo menos aproximadamente 80 % y más preferentemente por lo menos aproximadamente 95 % de identidad entre las secuencias. La presente invención se refiere especialmente a polinucleótidos que codifican polipéptidos que se hibridan en condiciones restrictivas a los polinucleótidos antes descriptos. En la presente se utiliza el término "condiciones restrictivas" para indicar "condiciones de hibridación restrictivas". De preferencia, la hibridación se produce sólo si hay por lo menos aproximadamente 90 % y preferentemente por lo menos aproximadamente 95

% a 97 % de identidad entre las secuencias. Los polinucleótidos que se hibridan a los polinucleótidos antes descritos en una realización preferida codifican polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que el polipéptido maduro codificado por los ADNc.

Cada una de las expresiones "equivalente funcional" y "sustancialmente la misma función o actividad biológica" significa que el grado de actividad biológica que está dentro de aproximadamente 30 % a 100 % o más de dicha actividad biológica demostrada por el polipéptido con el cual se lo está comparando, cuando se determina la actividad biológica de cada polipéptido por el mismo procedimiento. Por ejemplo, el polipéptido que es funcionalmente equivalente a un polipéptido de la Fig. 1 es aquél que, al ser analizado en el ensayo de proximidad de centelleo de AMP cíclico del Ejemplo Específico 16, demuestra acumulación de cAMP en la línea celular CHO que expresa el receptor de PACAP/VIP R2 (PACAP R3).

Un polipéptido de la presente invención que es agonista de R3 es aquél que demuestra aproximadamente 30 % - 100 % o más de máxima actividad agonista de PACAP-27 R3 al ser analizado según el protocolo del Ejemplo 16. Los polipéptidos preferidos de la presente invención que son agonistas selectivos de R3 con preferencia sobre los receptores de PACAP R2 y R1 son los polipéptidos que demuestran la relación de actividad agonista de R3 contra actividad de R2 de aproximadamente 10:1 o más y, más preferentemente, de aproximadamente 100:1 o más y/o demuestra la relación de actividad agonista de R3 a actividad del receptor R1 de aproximadamente 10:1 o más y, más preferentemente, de aproximadamente 100:1 o más al analizar el polipéptido según el protocolo del Ejemplo 16, utilizando células que expresen los receptores apropiados.

"Condiciones restrictivas de hibridación" se refiere a una incubación durante la noche de los dos trozos de polinucleótidos a hibridar, a 42°C en una solución que contiene 50 % de formamida, 5x SSC (750 mM de NaCl, 75 mM de citrato de sodio), 50 mM de fosfato de sodio (pH 7,6), 5x solución de Denhardt, 10 % de sulfato de dextrano y 20 µg/ml de ADN de espermatozoos de salmón purificado y desnaturalizado, seguido por lavado de los filtros en 0,1x SSC a aproximadamente 65°C.

Los términos "fragmento", "derivado" y "variante", con referencia a los polipéptidos de la Fig. 1, significan fragmentos, derivados y variantes de los polipéptidos que retienen sustancialmente la misma función o actividad biológica que dichos polipéptidos, de acuerdo con lo descrito más detalladamente más adelante.

Un análogo incluye un polipéptido que incluyen en su interior la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente invención. El polipéptido activo de la presente invención puede ser escindido de los otros aminoácidos que completan la molécula propolipeptídica mediante procesos naturales, in vivo, o por procedimientos muy conocidos en la técnica tales como por escisión enzimática o química. Por ejemplo, el péptido nativo de 28 aminoácidos VIP es expresado naturalmente como un polipéptido mucho mayor que luego es procesado in vivo para liberar el péptido maduro activo de 28 aminoácidos.

Un fragmento es una porción del polipéptido que retiene actividad funcional sustancialmente similar, como se demuestra en los modelos in vivo descritos más adelante en la presente.

Un derivado incluye todas las modificaciones del polipéptido, que sustancialmente conserva las funciones descritas en la presente e incluye una estructura adicional con la función consiguiente, por ejemplo polipéptidos

PEGilados que tienen una vida media mucho mayor, polipéptidos de fusión que confieran especificidad por el target o una actividad adicional tal como toxicidad para un target pretendido, de acuerdo con lo descrito más adelante.

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

El fragmento, derivado o variante de los polipéptidos de la presente invención puede ser (i) aquél en el cual uno o más de los residuos aminoácidos son sustituidos con un residuo aminoácido conservado o no conservado (preferentemente un residuo aminoácido conservado) y dicho residuo aminoácido sustituido puede o no ser un aminoácido codificado por el código genético o (ii) aquél en el cual uno o más de los residuos aminoácidos incluyen un grupo sustituyente o (iii) aquél en el cual el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, como por ejemplo un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol) o (iv) aquél en el cual los aminoácidos adicionales están fusionados al polipéptido maduro, como por ejemplo una secuencia guía o secretoria o una secuencia empleada para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia polipeptídica o (v) aquél en el cual la secuencia polipeptídica está fusionada con un polipéptido de mayor tamaño, es decir, una albúmina humana, un anticuerpo o Fc, para aumentar la duración del efecto. Tales fragmentos, derivados y variantes y análogos se consideran dentro del alcance de los expertos en la técnica, teniendo en consideración las indicaciones de la presente.

De preferencia, los derivados de la presente invención contienen sustituciones conservadoras de aminoácidos (como se definen más adelante en forma más detallada) realizadas en uno o más residuos aminoácidos previstos, preferentemente no esenciales. Un residuo aminoácido "no esencial" es un residuo que puede ser modificado con respecto a la secuencia salvaje

de una proteína sin alterar la actividad biológica, en tanto que un residuo aminoácido "esencial" es necesario para la actividad biológica. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la cual el residuo aminoácido es reemplazado por un residuo aminoácido con similar cadena lateral. Las familias de residuos aminoácidos con cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales beta ramificadas (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Las sustituciones no conservadoras se llevarían a cabo para residuos aminoácidos conservados o para residuos aminoácidos que residen dentro de un dominio proteico conservado, como por ejemplo los residuos 19 y 27, donde tales residuos son esenciales para la actividad proteica como la actividad de R3 y/o la selectividad por R3. Los fragmentos o porciones biológicamente activos incluyen fragmentos polipeptídicos adecuados para usar como medicamento, para generar anticuerpos, como reactivo de investigación y similares. Los fragmentos incluyen péptidos que comprenden secuencias de aminoácidos suficientemente similares o derivadas de las secuencias de aminoácidos de un polipéptido de la presente invención y que exhiben por lo menos una actividad de ese polipéptido, aunque incluyen menos aminoácidos que los polipéptido de longitud total descritos en la presente. Típicamente, las porciones biológicamente activas comprenden un dominio o motivo con al menos una actividad del polipéptido. Una porción biológicamente activa de un polipéptido

puede ser un péptido que tiene una longitud, por ejemplo, de 5 o más aminoácidos. Tales porciones biológicamente activas se pueden preparar por técnicas de síntesis o recombinantes y pueden ser evaluados en cuanto a una o más de las actividades funcionales de un polipéptido de la presente invención por medios descritos en la presente o muy conocidos en la técnica.

Más aun, los derivados preferidos de la presente invención incluyen polipéptidos maduros que se han fusionado con otro compuesto, como un compuesto para aumentar la vida media del polipéptido y/o para reducir la inmunogenicidad potencial del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol "PEG"). En el caso de la PEGilación, la fusión del polipéptido a PEG se puede lograr por cualquier medio conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede obtener la PEGilación introduciendo en primer lugar una mutación de cisteína en el polipéptido, seguida por la derivación de sitio específico con PEG- maleimida. La cisteína puede ser agregada al término C de los péptidos (ver, por ejemplo, Tsutsumi y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000 Jul 18, 97(15): 8548 – 53).

Las variantes de los polipéptidos de la presente invención incluyen polipéptidos con una sustitución de aminoácidos suficientemente similar a la secuencia de aminoácidos de las SEC. ID. NOS. de la Fig. 1 o un dominio de las mismas. El término "suficientemente similar" significa una primera secuencia aminoacídica que contiene un número suficiente o mínimo de residuos aminoácidos idénticos o equivalentes con respecto a una segunda secuencia de aminoácidos de tal manera que la primera y segunda secuencias de aminoácidos tengan un dominio estructural común y/o actividad funcional común. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos que contienen un dominio estructural común que es por lo menos aproximadamente 45 %, preferentemente aproximadamente 75 % a 98 % idéntico se definen en la

presenta como suficientemente similares. De preferencia, las variantes son suficientemente similares a la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos preferidos de la presente invención. Las variantes incluyen variantes de polipéptidos, codificados por un polinucleótido que se hibrida con un polinucleótido de la presente invención o un componente del mismo en condiciones restrictivas. Dichas variantes retienen generalmente la actividad funcionable de los polipéptidos de la presente invención. Se puede hacer uso de genotecas de fragmentos de los polinucleótidos para generar una población diversificada de fragmentos para el screening y la posterior selección. Por ejemplo, se puede generar una genoteca de fragmentos tratando un fragmento de PCR de doble cadena de un polinucleótido con una nucleasa en condiciones en las cuales se produce la mella sólo aproximadamente una vez por molécula, desnaturizando el ADN de cadena doble y renaturalizando el ADN para formar un ADN de cadena doble, que puede incluir pares de sentido/antisentido de productos mellados diferentes, retirar porciones de cadena simple de dúplexes reformados mediante tratamiento con nucleasa S1, y ligando la genoteca de fragmentos resultante en un vector de expresión. Por este método, se puede derivar una genoteca de expresión que codifica fragmentos N-terminales e internos de diversos tamaños del polipéptido de la presente invención.

Las variantes incluyen polipéptidos que difieren en la secuencia de aminoácidos debido a la mutagénesis. Las variantes que funcionan como agonistas de R3 pueden ser identificadas efectuando el screening de genotecas combinatorias de mutantes, como por ejemplo mutantes por truncamiento, de los polipéptidos de la presente invención para actividad agonista de R3.

En una realización, se genera una genoteca diversificada de análogos por mutagénesis combinatoria al nivel de los ácidos nucleicos y se la codifica por medio de una genoteca génica diversificada. Se puede producir una genoteca diversificada de variantes, por ejemplo, ligando enzimáticamente una mezcla de oligonucleótidos sintéticos en secuencias génicas de tal manera que se pueda expresar una serie degenerada de secuencias aminoacídicas variantes potenciales en forma de polipéptidos individuales o, por otro lado, como serie de proteínas de fusión de mayor tamaño (por ejemplo un despliegue de fagos) que contenga la serie de secuencias de las mismas. Hay una cantidad de métodos que se pueden utilizar para producir genotecas de variantes potenciales a partir de una secuencia oligonucleotídica degenerada. La síntesis química de una secuencia génica degenerada se puede efectuar en un sintetizador automático de ADN, para luego ligar el gen sintético en un vector de expresión apropiado. El uso de una serie degenerada de genes da lugar a la producción, en una mezcla, de todas las secuencias que codifican la serie deseada de secuencias variantes potenciales. Los métodos para sintetizar oligonucleótidos degenerados son conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Narang (1983) *Tetrahedron* 39:3, Itakura y otros (1984) *Annu. Rev. Biochem.* 53: 323; Itakura y otros (1984) *Science* 198: 1056; Ike y otros (1983) *Nucleic Acid Res.* 11: 477).

En la técnica se conocen varias técnicas para el screening de productos génicos o genotecas de combinación formadas por mutaciones de punto o truncamiento y para el screening de genotecas de ADNc para productos génicos con una propiedad determinada. Esas técnicas son adaptables para rápido screening de las genotecas génicas generadas por la mutagénesis combinatoria de polipéptidos agonistas de R. Las técnicas más ampliamente utilizadas, que se adecuan a los análisis de alta producción para el screening

de grandes genotecas genéticas incluyen típicamente la clonación de la genoteca génica en vectores de expresión replicables, la transformación de células apropiadas con la genoteca de vectores resultante y la expresión de genes combinatorios en condiciones en las cuales la detección de una actividad deseada facilite el aislamiento del vector que codifica el gen cuyo producto se ha detectado. La mutagénesis de ensamble recursivo (REM), una técnica que aumenta la frecuencia de los mutantes funcionales en las genotecas, se puede utilizar en combinación con los ensayos de screening para identificar las variantes deseadas.

La invención presenta asimismo polipéptidos quiméricos o de fusión. Entre los ejemplos se incluyen los polipéptidos de la presente invención descritos en las SEC. ID. NOs: 16 y 172, que son fusiones de la secuencia pancreática de direccionamiento hacia un target "SWCEPGWCR" (Rejto D., y otros (1998) J. Clin. Invest 102: 430 – 437) con SEC. ID. NO: 8 Y SEC. ID. NO: 32, respectivamente. La secuencia de direccionamiento hacia el target está diseñada para localizar la distribución del polipéptido al páncreas a fin de minimizar los efectos secundarios. Los polipéptidos de la presente invención se pueden componer de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos o enlaces peptídicos modificados, es decir, isoésteres, y pueden contener aminoácidos que no sean los 20 aminoácidos codificados por el gen. Los polipéptidos pueden ser modificados ya sea por procesos naturales, como el procesamiento postraducción, o por técnicas de modificación química muy conocidas en la técnica. Tales modificaciones han sido perfectamente descritas en textos básicos y en monografías más detalladas, así como en una voluminosa literatura de investigaciones. Las modificaciones se pueden producir en cualquier punto de un polipéptido, incluyendo la columna vertebral peptídica, las cadenas laterales de aminoácidos y los términos amino o

carboxilo. Se apreciará que se puede presentar el mismo tipo de modificación en el mismo o en diversos grados en varios puntos de un determinado polipéptido. Además, un determinado polipéptido puede contener muchos tipos de modificaciones. Los polipéptidos pueden ser ramificados, por ejemplo como resultado de la ubiquitinación, y pueden ser cíclicos con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden ser resultado de procesos naturales posteriores al a traducción o pueden ser preparados por métodos sintéticos. Las modificaciones incluyen acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, enlace covalente de flavina, enlace covalente de una porción hemo, enlace covalente de un derivado nucleotídico o nucleosídico, enlace covalente de un lípido o derivado lipídico, enlace covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de puentes de disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formulación, gama-carboxilación, glucosilación, formación de anclajes de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, nistilación, oxidación, pegilación, procesamiento proteolítico, fosforilación, fenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación y ubiquitinación (ver, por ejemplo, Proteins, Structure and Molecular Properties, 2a. edic. T. E. Craighton, W. H. Freeman and Company, Nueva York (1993); Posttranslational Covalent Modification of Proteins, B. C. Johnson edit., Academic Press, Nueva York, páginas 1 – 12 (1983); Seifter y otros, Meth. Enzymol. 182: 626 – 646 (1990); Rattan y otros, Ann. N.Y. Acad. Sci. 663: 48 – 62 (1992)).

Los polipéptidos de la presente invención incluyen los polipéptidos de la Fig. 1, que son las SEC. ID. NOS: 11 a 14, SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NOS: 21 a 25, 21 a 26, SEC. ID. NO: SEC. ID. NOs 32 a 36, SEC. ID. NOs: 40 a 53,

SEC. ID. NOs 57 a 61, SEC. ID. NOs 63 a 99, SEC. ID. NOs: 102 a 119, SEC. ID. NOs: 121 a 137, SEC. ID. NOs: 139 a 177, SEC. ID. NOs: 179, 180, SEC. ID. NOs: 183 a 202, y SEC. ID. NOs: 322 a 341, así como las secuencias que presentan variaciones de secuencia no sustanciales con respecto a las mismas. Una "variación no sustancial" incluiría cualquier secuencia variante, por sustitución o delección, que mantenga sustancialmente por lo menos una función biológica de los polipéptidos de la presente invención, preferentemente la actividad agonista de R3, y más preferentemente actividad agonista selectiva por R3 y muy preferentemente, actividad secretora de insulina demostrada en la presente. Estos equivalentes funcionales pueden incluir preferentemente polipéptidos que tienen por lo menos aproximadamente 90 % de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1, y muy preferentemente por lo menos 95 % de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1 y aun más preferentemente, por lo menos 97 % de identidad con los polipéptidos de la Fig. 1, y que también incluyen porciones de dichos polipéptidos con sustancialmente la misma actividad biológica. No obstante, en la presente invención se incluye cualquier polipéptido que tenga alguna variación no sustancial de la secuencia de aminoácidos con respecto a los polipéptidos de la Fig. 1, que demuestre equivalencia funcional de acuerdo con lo descrito más adelante.

Como es de conocimiento de los especialistas, la "similitud" entre dos polipéptidos se determina mediante la comparación de la secuencia de aminoácidos y sus sustitutos aminoácidos conservados de un polipéptido con la secuencia de un segundo polipéptido. Dichas sustituciones conservadoras incluyen las descritas anteriormente y por Dayhoff en The Atlas of Protein Sequense and Structure 5 (1978) y por Argos en EMBO J., 8: 779 – 785 (1989). Por ejemplo, los aminoácidos que pertenecen a uno de los siguientes grupos representan cambios conservadores:

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

La presente invención se relaciona asimismo con vectores que incluyen polinucleótidos de la presente invención, células huésped que son genéticamente modificadas con vectores de acuerdo con la presente invención y la producción de polipéptidos de la presente invención por técnicas recombinantes. Las células huésped pueden ser genéticamente modificadas (transducidas o transformadas o transfectadas) con los vectores de la presente invención que pueden ser, por ejemplo, un vector de clonación o un vector de expresión. El vector puede estar, por ejemplo, en forma de plásmido, de partícula viral, de fago, etc. Las células huésped modificadas pueden ser cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados como se considere apropiado para activar promotores o seleccionar transformantes. Las condiciones de cultivo, como las de temperatura, pH y similares, son las utilizadas anteriormente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y han de resultar evidentes para los técnicos normalmente capacitados. El polinucleótido de la presente invención puede ser utilizado para producir un polipéptido por técnicas recombinantes. Por consiguiente, por ejemplo, se puede incluir la secuencia polinucleotídica en cualquiera de una variedad de vehículos de expresión, en especial vectores o plásmidos para expresar un polipéptido. Dichos vectores incluyen secuencias de ADN cromosómico, no cromosómico y sintético, por ejemplo derivados de SV40, plásmidos bacterianos, ADN de fagos, plásmidos de levadura, vectores derivados de

combinaciones de plásmidos y ADN de fagos, ADN viral tal como vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, y la pseudorrabia. Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro vector o plásmido siempre que sea replicable y viable en el huésped.

Se puede insertar la secuencia de ADN apropiada en el vector mediante una variedad de procedimientos. En general, se inserta la secuencia de ADN en un sitio de restricción por endonucleasa mediante procedimientos conocidos en la técnica. Tales procedimientos y otros se consideran dentro del alcance de los técnicos capacitados. La secuencia de ADN en el vector de expresión está operativamente ligada a una o más secuencias control de expresión apropiadas (promotores) para dirigir la síntesis de ARNm. Como ejemplos representativos de tales promotores, se pueden mencionar: el promotor LTR o SV40, el promotor  $P_L$  del fago lambda, de *E. coli*, lac o trp y otros promotores conocidos por su control de la expresión de genes en células procarióticas o eucarióticas o sus virus. El vector de expresión contiene también un sitio de unión de ribosomas para la iniciación de la traducción y un terminador de transcripción. El vector puede incluir además secuencias apropiadas para la expresión por amplificación. Por añadidura, los vectores de expresión contienen preferentemente un gen para conferir un rasgo fenotípico para la selección de células huésped transformadas tales como reductasa dihidrofolato o resistencia a la neomicina para un cultivo celular de eucariotas, o como de resistencia a la tetraciclina o la ampicilina en *E. coli*. Se puede utilizar el vector que contiene la secuencia de ADN apropiada como se describiera anteriormente, así como un promotor o secuencia de control apropiada, para transformar un huésped apropiado a fin de permitir que el huésped exprese la proteína. Como ejemplos representativos de huéspedes apropiados, se pueden mencionar: células bacterianas tales como *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptomyces*; células

fúngicas tales como levadura, células de insectos tales como *Drosophila* S2 y *Spodoptera* Sf9, células animales tales como CHO, COS o melanoma de Bowes; adenovirus, células vegetales, etc. La selección de un huésped apropiado se considera dentro del alcance de las personas capacitadas en la técnica a la luz de lo aquí expuesto.

La presente invención incluye construcciones recombinantes que comprenden una o más de las secuencias descritas anteriormente en términos generales. Las construcciones comprenden un vector, como un vector plásmido o viral, en el cual se ha insertado una secuencia de la presente invención, en orientación de avance o inversa. En un aspecto preferido de esta realización, la construcción comprende además secuencias reguladoras incluyendo, por ejemplo, un promotor, operativamente ligadas a la secuencia. Los expertos en la técnica conocen grandes números de vectores y promotores adecuados, que se pueden adquirir en el comercio. Se presentan, a manera de ejemplo, los siguientes vectores: Bacterianos: pQE70, pQE60, pQE-9 (Qiagen), pBS, phagescript, psiX174, pBluescript SK pBsKS, pNH8a, pNH16a, pNH18a, pNH46a (Stratagene); pTRC99A, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, PRIT5 (Pharmacia). Eucarióticos: pWLneo, pSV2cat, pQG44, pXT1, pSG (Stratagene), pSVK3, pBPV, pMSG, PSVL (Pharmacia). Sin embargo, se puede utilizar cualquier otro plásmido o vector siempre que sea replicable y viable en un huésped. Se pueden seleccionar regiones promotoras de cualquier gen deseado utilizando vectores de CAT(cloranfenicol transferasa) u otros vectores con marcadores seleccionables. Dos vectores apropiados son pKK232-8 y pCM7. Entre los promotores bacterianos con nombres específicos se cuentan lac, lacZ, T3, T7, gpt, lambda P<sub>R</sub>, P<sub>L</sub> y Trp. Los promotores de eucariotas incluyen CMV inmediato precoz, HSV timidina quinasa, SV40 precoz

y tardío, LTRs de retrovirus y metalotioneína-I de ratón. La selección del vector y promotor apropiado es de competencia absoluta de los técnicos capacitados.

La presente invención se relaciona asimismo con células huésped que contienen la construcción que acaba de describirse. La célula huésped puede ser una célula eucariótica superior, como una célula de mamífero, o una célula eucariótica inferior como una célula de levadura, o la células huésped puede ser una célula procariótica, como una célula bacteriana. La introducción de la construcción en la célula huésped se puede efectuar por la transfección con fosfato cálcico, transfección mediada por DEAE-Dextrano o por electroporación (Davis, L., Digner, M. Battay, I., Basic Methods in Molecular Biology (1986)). Las construcciones en las células huésped se pueden utilizar de modo convencional para producir el producto génico codificado por la secuencia recombinante. Por otro lado, los polipéptidos de la presente invención pueden ser producidos mediante sintetizadores peptídicos convencionales.

Las proteínas maduras pueden ser expresadas en células de mamífero, levadura, bacterias u otras células bajo el control de los promotores apropiados. También se pueden emplear sistemas de traducción sin células para producir dichas proteínas empleando ARNs derivados de construcciones de ADN de la presente invención. Los vectores de clonación y expresión apropiados para utilizar con huéspedes procarióticos y eucarióticos han sido descritos por Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición (Cold Spring Harbor, N. Y., 1989), cuyo texto se incorpora a la presente como referencia.

La transcripción de un ADN que codifica los polipéptidos de la presente invención por eucariotas superiores se aumenta mediante la inserción de una secuencia intensificadora en el vector. Los intensificadores son elementos de ADN que actúan en cis, habitualmente desde aproximadamente 10 a 300 pb,

que actúan sobre un promotor para incrementar su transcripción. Entre los ejemplos se incluyen el intensificador SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100 a 270), un intensificador del promotor temprano de citomegalovirus, un intensificador de polio en el lado tardío del origen de replicación e intensificadores de adenovirus.

En general, los vectores de expresión recombinante incluyen orígenes de replicación y marcadores seleccionables que permiten la transformación de una célula huésped, por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina de *E. Coli* y el gen TRP1 de *S. Carvisiae*, así como un promotor derivado de un gen altamente expresado para dirigir la transcripción de una secuencia estructural posterior. Tales promotores se pueden obtener a partir de operones que codifican enzimas tales como la 3-fosfoglicerato quinasa (PGK), el factor  $\alpha$ , la fosfatasa ácida o las proteínas termosensibles, entre otros. La secuencia estructural heteróloga se ensambla en la fase apropiada con las secuencias de traducción, iniciación y terminación y, preferentemente, una secuencia guía capaz de dirigir la secreción de la proteína traducida en el espacio plasmático o el medio extracelular. Optativamente, la secuencia heteróloga puede codificar una proteína de fusión que incluye un péptido identificador N-terminal que imparte las características deseadas, por ejemplo la estabilización o la purificación simplificada del producto recombinante expresado.

Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano se construyen insertando una secuencia de ADN estructural que codifica una proteína deseada junto con las señales de traducción, iniciación y terminación en fase de lectura operable con un promotor funcional. El vector comprende uno o más marcadores seleccionables fenotípicos y un origen de replicación a fin de garantizar el mantenimiento del vector y si es conveniente, para producir la amplificación en el huésped. Los huéspedes procarióticos adecuados para la

transformación incluyen *E. Coli*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium* y diversas especies dentro de los géneros *Pseudomonas*, *Streptomyces*, y *Staphylococcus*, si bien también se pueden emplear otros de elección. Los vectores de expresión útiles para uso bacteriano pueden comprender un marcador seleccionable y origen de replicación bacteriano derivado de plásmidos que se pueden adquirir en el comercio, que comprenden elementos genéticos del conocidísimo vector de clonación pBR322 (ATCC 37017) Tales vectores comerciales incluyen, por ejemplo, pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Suecia) y GEM1 (promega Biotec. Madison, Wisconsin, USA). Estas secciones de cadena "vertebral" de pBR322 se combinan con un promotor adecuado y la secuencia estructural a expresar.

Realizada la transformación de una cepa huésped adecuada y el cultivo de la cepa huésped por medios apropiados, (por ejemplo, desplazamiento térmico o inducción química) y las células se cultivan durante un período adicional. Típicamente las células son cosechadas por centrifugación, rotas por medios físicos o químicos y se retiene el extracto crudo así producido para su posterior purificación. Las células microbianas empleadas para la expresión de proteínas pueden ser rotas por cualquier método conveniente, incluyendo ciclado por congelación descongelación, sonicado, rotura mecánica o por el uso de agentes de lisado celular.

También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo celular de mamíferos para expresar proteínas recombinantes. Entre los ejemplos de sistemas de expresión de mamíferos se cuentan las líneas COS-7 de fibroblastos renales de monos, descritos por Gluzman, Cell 23: 175 1981) y otras líneas celulares capaces de expresar un vector compatible, por ejemplo las líneas celulares C127, 3T3, CHO, HeLa y BHK. Los vectores de expresión en mamíferos incluyen un origen de replicación, un promotor e intensificador

adecuados y también cualquier sitio de ligamiento ribosómico necesario, sitios donadores y aceptadores de empalme, secuencias de terminación de transcripción, y secuencias no transcritas flanqueantes de 5'. Las secuencias de ADN derivadas del genoma viral de SV40, por ejemplo, los sitios de origen de SV40, el promotor temprano, el corte y empalme y de poliadenilación se pueden utilizar para producir los elementos genéticos no transcritos necesarios. Los polipéptidos de la presente invención pueden ser recuperados y purificados a partir de cultivos celulares recombinantes por métodos ya utilizados, incluyendo precipitación con sulfato de amonio o etano, extracción con ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía con fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía por afinidad, cromatografía con hidroxiapatita y cromatografía con lectinas. Se pueden utilizar pasos de replegamiento de proteínas, si es necesario, para completar la configuración de la proteína madura. Por último, se puede emplear la cromatografía de líquido de alta resolución (HPLC) para los pasos de purificación finales.

Los polipéptidos de la presente invención pueden constituir un producto de procedimientos de síntesis química o pueden ser producidos por técnicas recombinantes a partir de huéspedes procarióticos y eucarióticos (por ejemplo por células bacterianas, de levadura, de plantas superiores, insectos y mamíferos en cultivo). Dependiendo del huésped empleado en un procedimiento de producción recombinante, los polipéptidos de la presente invención pueden ser glucosilados con carbohidratos de mamíferos o de otras eucariotas o pueden ser no glucosilados. Los polipéptidos de la presente invención pueden incluir asimismo un residuo aminoácido inicial de metionina. Un polipéptido aislado o purificado de la presente invención, o una porción biológicamente activa del mismo, está sustancialmente libre de otro material

celular o medio de cultivo si es producido por técnicas recombinantes, o está sustancialmente libre de precursores químicos u otras sustancias químicas cuando es sintetizado químicamente. Un polipéptido aislado de la presente invención carece sustancialmente, de ser posible, de material celular y tiene menos de aproximadamente 30 % (en peso seco) de material no polipeptídico o contaminante. Cuando el polipéptido de la presente invención o una porción biológicamente activa del mismo es producido por medios recombinantes, el medio de cultivo representa preferentemente menos de aproximadamente 30 % del volumen de la preparación del polipéptido. Cuando esta invención es producida mediante síntesis química, es preferible que las preparaciones contengan menos de aproximadamente 30 % en peso seco de precursores químicos o productos químicos que no sean de la presente invención.

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser convenientemente aislados de acuerdo con lo descrito en los ejemplos específicos expuestos más adelante. Una preparación de polipéptido purificado tiene una pureza de por lo menos aproximadamente 70 %; preferentemente, las preparaciones tienen una pureza de 85 % a 99 %. La pureza de las preparaciones puede ser evaluada por cualquier medio conocido en la técnica, tal como SDS-electroforesis en gel de poliacrilamida y Cromatografía líquida/ Espec. Masas.

Las secuencias polinucleotídicas que codifican un polipéptido de la presente invención pueden ser sintetizadas, en totalidad o en parte, utilizando métodos químicos muy conocidos en la técnica (ver, por ejemplo, Caruthers y otros, *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.* 215 – 223, 1980. Horn y otros, *Nucl. Acids. Res. Symp. Ser.* 225 – 232, 1980). El poli nucleótido que codifica el polipéptido puede ser clonado a continuación en un vector de expresión para expresar el polipéptido.

Como sabrán comprender los expertos en la técnica, puede ser ventajoso producir las secuencias nucleotídicas que codifican al polipéptido que poseen codones que no se producen naturalmente. Por ejemplo, se pueden seleccionar los codones preferidos por un huésped procariontico o eucariótico determinado para aumentar la tasa de expresión del p o para producir un transcripto de ARN con propiedades convenientes, tales como una vida media más prolongada que la de un transcripto generado a partir de la secuencia de origen natural.

Las secuencias nucleotídicas descritas en la presente pueden ser modificadas empleando métodos generalmente conocidos en la técnica para alterar las secuencias codificadoras de polipéptidos por una variedad de razones, que incluyen, aunque no se limitan a, alteraciones que modifican el cierre, procesamiento y/o expresión del polipéptido o el producto de ARNm. La desorganización de ADN por fragmentación al azar y reensamblaje por PCR de los fragmentos génicos y los oligonucleótidos sintéticos se puede utilizar para modificar las secuencias nucleotídicas. Por ejemplo, se puede utilizar la mutagénesis de sitio para insertar nuevos sitios de restricción, alterar los patrones de glucosilación, cambiar la preferencia por los codones, producir variantes de corte y empalme, introducir mutaciones y demás.

Por otro lado, los polipéptidos de la presente invención se pueden producir utilizando métodos químicos para sintetizar su secuencia de aminoácidos, como ser por síntesis peptídica directa empleando técnicas en fase sólida (ver, por ejemplo, Merifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149- 2154, 1963; Roberge y otros, *Science* 269: 202 -204 (1995). La síntesis de polipéptidos puede realizarse empleando técnicas manuales o por instrumentos automáticos. La síntesis automática se puede obtener, por ejemplo, utilizando el Sintetizador de Péptidos Applied Biosystems 431<sup>a</sup> (Perkin Elmer).

Optativamente, se pueden sintetizar por separado fragmentos de polipéptidos y combinar los mismo utilizando métodos químicos para producir una molécula completa.

El polipéptido recién sintetizado puede ser sustancialmente purificado por cromatografía líquida de alta resolución preparatoria (ver, por ejemplo, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co. Nueva York, N.Y., 1983). La composición de un polipéptido sintético de la presente invención puede ser confirmada por análisis de aminoácidos o secuenciación, por ejemplo, por el procedimiento de degradación de Edman (ver Creighton, *supra*). Además, se puede modificar cualquier porción de la secuencia aminoacídica del polipéptido durante la síntesis directa y/o combinada utilizando métodos químicos, con secuencias de otras proteínas para producir un polipéptido variante o un polipéptido de fusión.

Los polipéptidos de la presente invención, como resultado de la capacidad para estimular la secreción de insulina por las células de los islotes pancreáticos in vitro, así como para provocar una reducción de la glucosa sanguínea in vivo, pueden ser empleados en el tratamiento de la Diabetes tipo 2 (diabetes mellitus no insulino dependiente). Además, los polipéptidos se pueden utilizar para impedir que sujetos con tolerancia a la glucosa deteriorada desarrollen la diabetes de tipo 2. Más aun, los polipéptidos de la presente invención se pueden utilizar para el tratamiento del asma (Bolin y otros, *Biopolymer* 37: 57 – 66 (1995); Patente de los Estados Unidos No. 5.677.419) (que demuestra que el péptido R3PD es activo en la relajación del músculo liso traqueal de conejillos de Indias); inducción de hipotensión (el VIP induce hipotensión, taquicardia y rubor facial en pacientes asmáticos (Monce, A. H. Y Sever P. S., *Peptides* 7: 279 – 280 (1986); Monce A. Y otros, *The Lancet* II, 1225 – 1227 (1983)), problemas de reproducción masculina (Siow, Y. Y otros,

Efectos del péptido intestinal vasoactivo sobre la motilidad de los espermatozoides humanos, Arch. Androl, 1999 Jul – Ago; 43 (1) 67 – 71), como agente antiapoptosis/ neuroprotector (Brenneman D.E. y otros, VIP neurotrophism in the central nervous system: multiple effectors and identification of a femtomolar-acting neuroprotective peptide, Ann. N. Y. Acad. Sci. 1998, diciembre. 11; 865 –207 –12); cardioprotección durante eventos isquémicos (Kalfin R. y otros Protective role of intracoronary vasoactive intestinal peptide in ischemic and reperfused myocardium, J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994 Feb; 268(2): 952 – 8; Das, D.K. y otros, Coordinated role of vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in cardioprotection, Ann., N. Y. Acad. Sci 1998 Dic. 11; 865; 297 – 308) y, por último, como agente antiulceroso. (Tuncel y otros, The protective effect of vasoactive intestinal peptide on stress-induced gastric ulceration in rats, Ann. N. Y. Acad. Sci 1998 Dic. 11; 865; 309 – 22.

El polipéptido de la presente invención se puede emplear en combinación con un vehículo farmacéutico adecuado para constituir una composición farmacéutica para la administración parenteral. Tales composiciones comprenden una cantidad terapéuticamente efectiva de un polipéptido un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. El mencionado vehículo incluye, aunque no se limita, a salina, salina con buffer, dextrosa, agua, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La formulación debe adecuarse al modo de administración. La invención presenta asimismo un envase o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Asociada con dicho recipiente (o recipientes) puede haber un prospecto en la forma prescrita por una repartición gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, prospecto

que debe reflejar la aprobación por la repartición de la elaboración, uso o venta para la administración a humanos. Además, los polipéptidos de la presente invención pueden ser empleados conjuntamente con otros compuestos terapéuticos.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser administradas en una forma conveniente, como por ejemplo por las vías oral, tópica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal o intradérmica. Las composiciones farmacéuticas se administran en una cantidad efectiva para el tratamiento y/o profilaxis de la indicación específica. En general, se los puede administrar en una cantidad de por lo menos aproximadamente 350 ng (0,1 nmol)/ kg de peso corporal y, en la mayoría de los casos, se los administra en una cantidad no superior a aproximadamente 35 µg (10 nmol)/kg de peso corporal por día. En la mayor parte de los casos, el dosaje es de aproximadamente 0,1 µg/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal diarios, tomando en cuenta las vías de administración, los síntomas, etc. Estos números no toman en cuenta la biodisponibilidad del péptido in vivo, en cuyo caso se puede utilizar más o menos cantidad para obtener la dosis efectiva buscada. Una persona capacitada en la técnica puede determinar, mediante experimentos de dosificación u otro medio convencional, la cantidad bruta a utilizar para producir una dosis efectiva.

Un polipéptido de la presente invención puede emplearse asimismo de conformidad con la presente invención mediante la expresión del polipéptido in vivo, a lo que frecuentemente se hace referencia como "terapia génica". Así, por ejemplo, las células pueden ser modificadas con un polinucleótido (ADN o ARN) que codifica para el polipéptido ex vivo, luego se transmiten las células modificadas a un paciente que debe ser tratado con el polipéptido. Tales métodos son muy conocidos en la técnica. Por ejemplo, las células pueden ser

modificadas por procedimientos conocidos en la técnica mediante el uso de una partícula retroviral que contiene ARN que codifica para el polipéptido de la presente invención.

La administración local de los secretagogos de insulina empleando terapia génica puede aportar el efecto terapéutico al área objetivo, es decir, al páncreas. Por ejemplo, se utilizó un promotor específico para el páncreas para generar un modelo de tumor pancreático de células beta en ratones (Hanahan, D., Heritable formation of pancreatic beta-cell tumors in transgenic mice expressing recombinant insulin/ similar virus 40 oncogenes, *Nature* 315(6015): 115 – 22 (1985)).

Se contemplan metodologías de terapia génica tanto in vitro como in vivo. Se conocen varios métodos para transferir genes potencialmente terapéuticos a poblaciones celulares definidas. Ver, por ejemplo, "The Basic Science of Gene Therapy", *Science*, 260: 926 – 31 (1993). Estos métodos incluyen:

1) Transferencia directa de genes. Ver, por ejemplo, Wolff y otros, "Direct Gene transfer into Mouse Muscle in Vivo", *Science*, 247: 1465 – 68 (1990);

2) Transferencia de ADN mediada por liposomas. Ver, por ejemplo, Caplen y otros, "Liposome-Mediated CFTR Gene Transfer To the Nasal Epithelium of Patients with Cystic Fibrosis", *Nature Med.* 3: 39 – 45 (1995); Crystal, "The Gene as a Drug", *Nature Med.* 1: 15 – 17 (1995); Gao y Huang, "A Novel Cationic Liposome Reagent For Efficient Transfection of Mammalian Cells", *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 179 – 280 – 85 (1991);

3) Transferencia de ADN mediada por retrovirus. Ver, por ejemplo, Kay y otros, "In Vivo Gene Therapy of Hemophilia B: Sustained Partial

Correction in Factor IX-Deficient Dogs", *Science*, 262: 117 – 19 (1993); Anderson, "Human Gene Therapy", *Science* 256: 808 – 13 (1992);

4) Transferencia de ADN mediada por ADN virus. Dichos ADN de virus incluyen adenovirus (preferentemente vectores basados en AD-2 o Ad.5), herpes virus (preferentemente vectores basados en virus herpes simplex) y parvovirus (preferentemente vectores basados en parvovirus "defectuosos" o no autónomos, más preferentemente vectores basados en virus adenomrelacionados, muy preferentemente vectores basados en AAV-2). Ver, por ejemplo, Ali y otros, "The Use of DNViruses AS Vectors For Gene Therapy" *Gene Therapy* 1: 367 – 84 (1994), la patente de los Estados Unidos 4.797.368, que se incorpora a la presente como referencia, así como la patente de los Estados Unidos No. 5.139.941, que se incorpora a la presente como referencia.

La elección de un determinado sistema de vectores para transferir el gen de interés dependerá de diversos factores. Un factor importante es la naturaleza de la población de células diana. Si bien los vectores retrovirales han sido extensamente estudiados y utilizados en un número de aplicaciones de terapia génica, estos vectores generalmente no son adecuados para infectar células indivisibles. Además, los retrovirus tienen el potencial de la oncogenicidad. Sin embargo, los recientes progresos en el campo de los vectores lentivirales pueden sortear algunas de estas restricciones. Ver Naldini y otros, *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*, *Science* 272: 263 – 7 (1996).

Los retrovirus a partir de los cuales se pueden obtener los vectores plasmídicos retrovirales mencionados anteriormente incluyen, aunque no se limitan al virus de la leucemia Murina de Moloney, el virus de la necrosis esplénica, retrovirus tales como el Virus del Sarcoma de Rous, el Virus del

Sarcoma de Harvey, el virus de la leucosis aviar, el virus de la leucemia del mono gibón, el virus de inmunodeficiencia humana, adenovirus, Virus del Sarcoma Mieloproliferativo y el virus del tumor mamario. En una realización, el vector plasmídico retroviral se obtiene del Virus de Leucemia Murina de Moloney.

Los adenovirus tienen la ventaja de tener un amplio rango de huéspedes, pueden infectar células inmóviles o terminalmente diferenciadas, tales como neuronas o hepatocitos y parecen ser esencialmente no oncogénicos. Ver, por ejemplo, Ali y otros, obra mencionada, pág. 367. Los adenovirus no parecen integrarse al genoma del huésped. Dado que existen en forma extracromosómica, se reduce considerablemente el riesgo de mutagénesis por inserción. Ali y otros, obra mencionada, pág. 373.

Los virus adenorelacionados exhiben ventajas similares a los vectores a base de adenovirus. Sin embargo, los AAV exhiben integración de sitio específico en el cromosoma humano 1 (Ali y otros, obra mencionada, pág. 377).

En una realización preferida, se utiliza el ADN que codifica los secretagogos polipeptídicos de la insulina de acuerdo con la presente invención en terapia génica para trastornos tales como la diabetes.

De acuerdo con esta realización, se provee la terapia génica con ADN que codifica secretagogos polipeptídicos de la insulina o muteínas de acuerdo con la presente invención a un paciente que la necesita, simultánea con el diagnóstico o inmediatamente después del mismo.

El técnico capacitado sabrá apreciar que se puede utilizar cualquier vector de terapia génica adecuado que contenga los secretagogos polipeptídicos de insulina, ADN o fragmento, derivado o variante de ADN de los secretagogos polipeptídicos de insulina de acuerdo con la presente invención.

Las técnicas para construir ese tipo de vector son conocidas. Ver, por ejemplo, Anderson, W. F., "Human Gene Therapy", *Nature*, 392: 25 – 30 (1998); Verma, I.M., y Somia, N., "Gene Therapy – Promises, Problems, and Prospects", *Nature*, 389 239 – 242 (1998). La introducción del vector que contiene los secretagogos polipeptídicos de la insulina al sitio diana puede efectuarse utilizando técnicas conocidas. El vector incluye uno o más promotores. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, aunque no se limitan al promotor retroviral LTR, el promotor SV40 y el promotor de citomegalovirus humano (CMV) descrito por Miller y otros, *Biotechniques* 7(9): 980 – 990 (1989) o cualquier otro promotor (por ejemplo, promotores celulares tales como promotores celulares eucarióticos que incluyen, aunque no se limitan a histona, pol III y promotores de  $\beta$  actina). Otros promotores virales que se pueden emplear incluyen, aunque sin limitarse a, promotores de adenovirus, promotores de timidina quinasa (TK) y promotores de parvovirus B19. La selección de un promotor adecuado resultará evidente para los expertos en la técnica a la luz de las indicaciones contenidas en el presente documento.

La secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido de la presente invención está bajo el control de un promotor adecuado. Los promotores adecuados que se pueden emplear incluyen, aunque no se limitan a, promotores adenovirales tales como el promotor tardío mayor adenoviral, o promotores heterólogos tales como el promotor de citomegalovirus (CMV), el promotor del virus sincitial respiratorio (RSV), promotores inducibles tales como el promotor MMT, el promotor de metalotioneína, promotores termosensibles, el promotor de albúmina, el promotor ApoA1, los promotores de globina humana, los promotores virales de timidinoquinasa tales como el promotor de timidina quinasa del Herpes Simplex, LTR retrovirales (incluyendo los LTR retrovirales

modificados descritos anteriormente), el promotor de  $\beta$ -actina y los promotores de hormona de crecimiento humana. El promotor puede consistir asimismo en el promotor nativo que controla el gen que codifica el polipéptido.

Se emplea el vector plasmídico retroviral para transducir líneas celulares de empaquetamiento para formar líneas celulares productoras. Entre los ejemplos de células de empaquetamiento que pueden ser transfectadas se cuentan, aunque sin limitarse a, las líneas celulares PE501, PA317,  $\psi$ 2,  $\psi$ -AM, PA12, T29-14X, VT-19-H2,  $\psi$ CRE,  $\psi$ CRIP, GP-E-86, GP+envAm12, y DAN, de acuerdo con lo descrito por Miller, Human Gene Therapy, 1 5-14 (1990), que se incorpora a la presente como referencia en su totalidad. El vector puede transducir las células de empaquetamiento por cualquier medio conocido en la técnica. Tales medios incluyen, sin limitarse a, electroporación, el uso de liposomas y precipitación con  $\text{CaPO}_4$ . En una alternativa, el vector plasmídico retroviral puede estar encapsulado en un liposoma o acoplado a un lípido y luego administrado a un huésped. La línea celular productora genera partículas de vectores retrovirales infecciosos que incluyen la o las secuencias de ácidos nucleicos que codifica a los polipéptidos. Luego se pueden emplear dichas partículas de vectores retrovirales para transducir células eucarióticas, ya sea in vitro como in vivo. Las células eucarióticas transducidas expresan la secuencia (las secuencias) de ácido nucleico que codifican el polipéptido. Las células eucarióticas que pueden ser transducidas incluyen, aunque no se limitan a células germinales embrionarias, células de carcinoma embrionario, así como células germinales hematopoyéticas, hepatocitos, fibroblastos, mioblastos, queratinocitos, células endoteliales y células del epitelio bronquial.

Un enfoque diferente de la terapia génica es la "terapia transcariótica" en la cual se tratan ex vivo las células de los pacientes a fin de inducir los genes cromosómicos adormecidos para producir la proteína de interés tras la

reintroducción en el paciente. La terapia transcariótica se basa en el supuesto de que el individuo tiene un complemento natural de los genes necesarios para la activación. La terapia transcariótica implica la introducción de un promotor u otra secuencia reguladora exógena capaz de activar los genes nacientes, en el ADN cromosómico de las células del paciente ex vivo, el cultivo y selección de células activas productoras de proteína y luego la reintroducción de las células activadas en el paciente con la intención de que puedan establecerse por completo. Las células "genéticamente activadas" elaboran luego la proteína de interés durante una cierta cantidad considerable de tiempo, tal vez durante el resto de vida del paciente. Las patentes de los Estados Unidos Nos. 5.641.670 y 5.733.761 describen este concepto en forma detallada, y se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

Para mejor comprender esta invención, se presentan los siguientes ejemplos. Estos ejemplos sólo tienen fines ilustrativos y no deben ser considerados limitantes de la presente invención en absoluto. Todas las publicaciones mencionadas en la presente se incorporan a la presente como referencia en su totalidad.

#### Ejemplo 1 – Protocolo para el aislamiento de los islotes de ratas

Se utilizaron ratas Sprague Dawley (275 – 320 g) como fuente de islotes de donante. En resumen, se llenó el páncreas con 10 ml de Liberasa RI fría reconstituida (Boehringer Mannheim) cosechada e incubada con 5 ml más de enzima en solución en baño acuoso por espacio de 30 minutos. Se lavó la suspensión tisular dos veces con buffer FBS al 10 %/ Hanks (Gibco), se la resuspendió en 8 ml de ficoll al 25 % (Sigma) y luego se la intercaló con 5 ml de ficoll al 23 %, 20 % y 11 %. Los islotes de la capa al 20 % fueron retirados tras la centrifugación, lavados dos veces con buffer frío de FBS al 10 %/ hank y resuspendidos en medios FBS al 10 %/ RPMI (Sigma).

**Ejemplo 2. Protocolo para Analizar la Elevación de los Niveles de Insulina Inducida por el Péptido en Ratas**

Se forzó el ayuno de ratas Wistar durante la noche (17 horas) y luego se las anestesió con pentobarbital (0,1 ml/ 100 g de BW). Se inyecta glucosa (0,4 g/kg disuelto en albúmina 1 %/ salina) +/- péptido (disuelto en 1 % de albúmina humana – salina) por vía intravenosa en la vena caudal. Se sangra a la ratas por los ojos durante 1 minuto tras la inyección y se analizan 50 – 100 ul del plasma para determinar el nivel de insulina con el Kit Linco RIA (Linco Research, Inc., St. Charles, MO).

**Ejemplo 3. Protocolo Para La Determinación Del Efecto De los Péptidos Sobre La Tolerancia A La Glucosa Intraperitoneal En Ratas**

Se forzó el ayuno de ratas Wistar durante la noche y luego se las anestesió con pentobarbital. Las ratas fueron sangradas por el ojo (hora cero) y se les inyectó el péptido (en albúmina humana al 1 %) en la vena caudal. Cinco minutos más tarde, se inyectó por vía intraperitoneal 1 g/kg de glucosa (en salina) y se sangraron los ojos de las ratas a los 15, 30 y 60 minutos. Se determinaron los niveles plasmáticos de glucosa utilizando el autoanalizador Technicon Axon, división Bayer Diagnostics de Bayer Corporation, Tarrytown NY, operado utilizando el Método No. SM4-2143F90 "Glucose".

**Ejemplo 4. Protocolo para Determinar el Efecto De los Péptidos Sobre la Retención de Agua Intestinal en Ratas**

Se forzó el ayuno de ratas machos por espacio de 24 horas,, y se les quitaron sus botellas de agua durante 2 – 3 horas antes del comienzo del experimento. Se inyectó el péptido o salina por vía subcutánea en ratas conscientes. Las ratas fueron sometidas a eutanasia con CO<sub>2</sub> 10 minutos después de la dosificación y se extirpó el intestino delgado y se lo pesó (1). Se

abrió el intestino, se absorbió el agua de la luz con papel de filtro y se volvió a pesar el intestino (2). La cantidad de agua intestinal (g) = peso (1) – peso (2).

#### **Ejemplo 5. Metodología de Síntesis de los Péptidos**

Se siguió el siguiente procedimiento general para sintetizar algunos de los polipéptidos de la invención. La síntesis peptídica se llevó a cabo usando la estrategia de FMOC/ t-butilo (Peptide Synthesis Protocols (1994), volumen 35 de Michael W Pennington & Ben M. Dunn) en condiciones de flujo continuo utilizando resinas PEG-poliéstereno de Rapp-Polymere (Rapp-Polymere, Tubingen, Alemania). Al finalizar la síntesis, se escindieron los péptidos de la resina y se los desprotegió empleando ATF/ DTT/H<sub>2</sub>O/ trisopropilsilano (88/5/5/2). Los péptidos precipitaron del cocktail de escisión utilizando éter dietílico frío. El precipitado fue lavado tres veces con el éter frío y luego se lo disolvió en ácido acético al 5 % antes de la liofilización. Los péptidos fueron verificados por cromatografía de fase inversa en una columna YMC-Pack ODS-AQ (YMC Inc, Wilmington, NC) en una disposición Waters ALLIANCE (denominación comercial) Waters Corporation, Milford, MA) empleando agua/ acetonitrilo con ATF al 3 % en forma de gradiente desde 0 % a 100 % de acetonitrilo, y por espectrometría de masas MALDI en un Espectrómetro de Masas VOYAGER de MALDI (denominación comercial) (modelo 5-2386-00. PerSeptive BioSystems, Framingham, MA). Se agregó el péptido muestra de buffer de matriz (50/50 dH<sub>2</sub>O/acetonitrilo con ATF al 3 %) a buffer de matriz 1/1. Los péptidos que no cumplieran los criterios de pureza de >95 % son purificados por cromatografía de fase inversa en una disposición de HPLC Waters Delta Prep 4000 (Waters Corporation, Milford, MA).

#### **Ejemplo 6. Clonación de Péptidos**

Ya se había intentado la expresión recombinante de VIP con resultados inciertos. Simoncsits y otros (Eur. J. Biochem. 178: 343 – 350 (1988)

expresaron Leu<sup>17</sup>, Gly<sup>28</sup>-VIP o Leu<sup>17</sup>Gly<sup>28</sup> Lys<sup>30</sup>Arg<sup>31</sup>-VIP como fusión C-terminal a la parte N-terminal del gen de  $\beta$ -galactosidasa en *E. Coli*. La eliminación de la metionina en la posición 17 elimina un sitio de escisión CNBR. La adición de Gly o Gly-Lys-Arg C-terminal tuvo por fin la amidación C-terminal potencial in vivo por PAMasa de mamífero. Ante la escisión con CNBR de las proteínas de fusión en la metionina introducida N-terminal con respecto a los mutantes VIP, los mutantes VIP libres fueron purificados y se demostró que poseían actividades similares a las del VIP nativo, si bien las actividades fueron medidas sólo en concentraciones de saturación de los péptidos. Raingeaud y otros (Biochimie 78: 14 – 25 (1996)) expresaron el VIP como fusiones poliméricas C-terminales con glutatión S-transferasa (GST) en *E. Coli*. Los péptidos VIP poliméricos o monoméricos fueron liberados tras escisiones en serie por el Factor Xa e hidroxilamina. El requisito para la escisión en dos pasos dio como resultado la ineficiencia y una mezcla de productos. Los péptidos poliméricos y monoméricos producidos por este método fueron menos activos que el VIP nativo. Una versión mejorada de la construcción utilizando sólo la escisión con Factor Xa dio origen a un VIP mutante con una prolongación de siete residuos C-terminal que también fue menos activo que el VIP nativo (Ottavi y otros, Biochimie 80: 289 – 293 (1998)). No se ha dado a conocer la expresión del PACAP hasta la fecha. A fin de establecer un método firme para la expresión de PACAP, VIP y sus mutantes, sus códigos genéticos fueron clonados en C-terminal con GST con un único sitio de reconocimiento de Factor Xa que separa al péptido monomérico y la GST. Se ha sintetizado el gen que codifica el sitio de reconocimiento de Factor Xa fusionado a la secuencia de ADN del péptido a producir hibridando dos fragmentos de ADN de cadena simple traslapados (70 – 90meros) que contenía un sitio de enzima de restricción Bam HI o Xho I inmediatamente 5' con respecto a la secuencia

de ADN del gen a clonar, seguido por la síntesis de ADN de las cadenas opuestas por medio del gran fragmento de ADN polimerasa I (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD). La secuencia de ADN elegida para cada gen se basó en la traducción inversa de la secuencia de aminoácidos diseñada de cada péptido. En algunos casos, el gen que codifica el péptido se genera por mutagénesis por PCR (Picard, V y otros, Nucleic Acids Res 22: 2587 – 91 (1994) Sambrook, J. Fritsch, E. F. & Maniatis, T (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª. Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York) de un gen ya preparado por el método descrito anteriormente.

Luego se digiere el producto de cadena doble mediante Bam HI y Xho I y se lo liga en pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech) que también ha sido escindido con Bam HI y Xho I. Las secuencias de ADN de los genes de los péptidos clonados están enumerados en la Figura 8.

Por ejemplo, cuando se clonan las secuencias de ADN de SEC. ID. NOS; 54, 55 y 56 en pGEX-6P-1, se expresan las siguientes secuencias polipeptídicas como fusiones con glutatión S-transferasa (GST).

PACAP 38: IEGRHSDGIFTDSYSRYRK

MAVKKYLA AVL GKRYKQ RVKNK (SEC. ID. NO: 2)

VIP IEGRHSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLN SILN (SEC. ID. NO: 1)

R3P3 IEGRHSDAVTENYTKLRKQLAAKKYLNDLKKG GT (SEC. ID. NO: 8)

En la Figura 3 se expone un mapa de restricción de un plásmido típico que contiene la fusión GST-péptido.

#### Ejemplo 7: Expresión Recombinante y Purificación del Péptido

Se cultivaron células BL21 (Stratagene) transformadas con la fusión GST-péptido que contenía plásmidos a 37°C hasta que la OD<sub>600</sub> llegó a 0,5 a 1,0 y se las indujo con 1 mM de IPTG (Life Technologies) durante 2 horas a

37°C. 2 l de células fueron centrifugados a 7.700 g por espacio de 15 minutos, pesados y almacenados a -20°C durante por lo menos 3 horas. Se resuspendió el pellet celular congelado en 100 ml de PBS helado con 250 µl de cocktail inhibidor de la proteasa (No. Cat. P-8465, Sigma Chemical) por gramo de células, se lo sometió a ultrasonido a 3x durante 1 minuto con intervalos de 15 segundos. Se centrifugo el desecho celular a 10.000 g durante 20 minutos. Se mezcló el sobrenadante con 2 ml de resina Glutathión Sepharose 4B al 50 % (Pharmacia) en un agitador durante la noche a 4°C. Las resinas fueron centrifugadas a 1500 g durante 15 minutos, empaquetadas en columnas de cromatografía Poly-Prep vacías (Bio-Rad), lavadas con 30 ml de PBS seguidas por 10 ml de buffer de Factor Xa (1 mM de CaCl<sub>2</sub>, 100 mM de NaCl y 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0). Los péptidos fueron escindidos de la columna por 60 unidades de Factor Xa (Pharmacia) en 1 ml de buffer Factor Xa durante la noche a 4°C y analizados en HPLC C18 (Beckman System Gold), empleando un bucle de 2 ml y una velocidad de flujo de 2 ml/min con el siguiente programa: 10 minutos de Buffer A (TFA 0,1 %/ H<sub>2</sub>O), 30 minutos de gradiente a Buffer B (TFA 0,1 %/ ACN), 10 minutos de Buffer A, 10 minutos de gradiente y 10 minutos de Buffer A. Las fracciones pico (1 ml de cada uno) fueron recogidas y analizadas por medio de electroforesis en gel de Tricina 10 – 20 % - SDS. Las fracciones que contenían los péptidos de la Tabla 1 fueron agrupadas y secadas. Los rendimientos típicos son de varios cientos de microgramos de péptidos libres por litro de cultivo de E. coli. Los péptidos recombinantes han demostrado tener las mismas actividades que sus versiones sintéticas.

La siguiente tabla contiene algunos polipéptidos seleccionados preparados de acuerdo con el protocolo de Síntesis de Peptidos antes descripto (Ejemplo 5) o en forma recombinante de acuerdo con lo descripto en

el Ejemplo 7. Los péptidos producidos por el método recombinante están indicados con una letra minúscula "r" delante de la designación del péptido. Los péptidos producidos por medios recombinantes y sintéticos están indicados por asteriscos junto a sus Números de Péptido. Los péptidos P3P0 y R3P4 fueron dados a conocer por Bolin y otros (Biopolymers 37: 57 – 66 (1995); patente de los Estados Unidos No. 5.677.419).

Tabla 1

| Peptide No. | Secuencia                                                                         | SEC ID NO. |
|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------|
| R3P0        | Ac-HSDAVFTENYTKLRKQNI <sup>a</sup> AAKKYLNDLKGGT-NH <sub>2</sub>                  | 5          |
| R3P1        | Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLKGGT-NH <sub>2</sub>                   | 6          |
| R3P2        | Ac-HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLKGGT                                   | 7          |
| rR3P3*      | HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLKGGT                                      | 8          |
| R3P4        | Ac-HSDAVFTEN(CH <sub>2</sub> O-Y)TKLRKQNI <sup>a</sup> AAKKYLNDLK-NH <sub>2</sub> | 9          |
| R3P5        | HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLK                                         | 10         |
| R3P6        | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKK-NH <sub>2</sub>                                        | 11         |
| rR3P6*      | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKGGT                                                     | 12         |
| R3P10       | HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLLNGGT                                     | 13         |
| R3P11       | HSDAVFTDNYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDILNGGT                                     | 14         |
| R3P12*      | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDIKKGGT                                      | 15         |
| R3P13       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDIKK-NH <sub>2</sub>                         | 16         |
| R3P14       | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLNDLKGGT                                                     | 17         |
| R3P18       | HSDAVFTENYTKLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDLKGGT <sup>a</sup> SWCEPGWCR               | 18         |
| R3P20       | HSDAVFTDNYTLRKQMA <sup>a</sup> AKKYLNDIKKGGT                                      | 19         |
| R3P21       | HSDAVFTDNYTLRKQLAVKKYLNDIKKGGT                                                    | 20         |
| R3P22       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNSIKKGGT                                      | 21         |
| R3P24       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDIKNGGT                                      | 22         |
| R3P25       | HSDAVFTDNYTLRKQLAVKKYLNSIKKGGT                                                    | 23         |
| R3P26       | HSDAVFTDNYTLRKQMA <sup>a</sup> AKKYLNSIKKGGT                                      | 24         |
| R3P29       | HSDAVFTDNYTLRKQLAVKKYLNDIKNGGT                                                    | 25         |
| R3P30       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNSIKNGGT                                      | 26         |
| R3P31       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDIKKGG                                       | 27         |
| R3P32       | HSDAVFTDNYTLRKQLA <sup>a</sup> AKKYLNDIKKG                                        | 28         |

|       |                                                      |    |
|-------|------------------------------------------------------|----|
| R3P33 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNDIKK                          | 29 |
| R3P34 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNDIKKO                         | 30 |
| R3P35 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNDIKKNO                        | 31 |
| R3P36 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNDIKKKRY                       | 32 |
| R3P41 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKK                           | 33 |
| R3P42 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKN                           | 34 |
| R3P43 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILK                           | 35 |
| R3P44 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILN                           | 36 |
| R3P45 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILN                           | 37 |
| R3P46 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILN                           | 38 |
| R3P47 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILN                           | 39 |
| R3P48 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLNILN                           | 40 |
| R3P49 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKN                           | 41 |
| R3P50 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSILK                           | 42 |
| R3P51 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKK                           | 43 |
| R3P52 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKKRY                        | 44 |
| R3P53 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKKR                         | 45 |
| R3P54 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKK                          | 46 |
| R3P55 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNRY                        | 47 |
| R3P56 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKKRY                        | 48 |
| R3P57 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKKR                         | 49 |
| R3P58 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKK                          | 50 |
| R3P59 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNRY                        | 51 |
| R3P60 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLOSICK                          | 52 |
| R3P61 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLOTIKK                          | 53 |
| R3P6  | HSDGIFTESYSRYRKQMAVKKYLAALKKKRYKQVRNK                | 57 |
| R3P7  | HSDAVFTENYTLRKQMAVKKYLSILKK-NH <sub>2</sub>          | 58 |
| R3P15 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLSAVRHGOT-NH <sub>2</sub>      | 59 |
| R3P16 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKQGGT-NH <sub>2</sub>      | 60 |
| R3P17 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKKYLAAVRHG-NH <sub>2</sub> | 61 |
| R3P18 | SWCEPGWCRHSDAVFTENYTLRKOLAACKYLNOLKGGT               | 62 |
| R3P23 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNOLKGGT                        | 63 |
| R3P27 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNOLNGGT                        | 64 |
| R3P28 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNOLKGGT                        | 65 |
| R3P37 | HSDGIFTDSYSRYRKOLAACKYLADVKKGGT                      | 66 |
| R3P38 | HSDGIFTDSYSRYRKOLAACKYLAOVKK                         | 67 |
| R3P39 | HSDGIFTDSYSRYRKOLAACKYLAOVKK                         | 68 |
| R3P40 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAOVKK                         | 69 |
| R3P62 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLSIKK                           | 70 |
| R3P63 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNR                         | 71 |
| R3P66 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLOSICKKNRY                      | 72 |
| R3P67 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNITIKKNRY                      | 73 |
| R3P68 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLSIKKNRY                        | 74 |
| R3P69 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLOSICKKNRY                      | 75 |
| R3P70 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLNITIKKNRY                      | 76 |
| R3P71 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNRY                        | 77 |
| R3P72 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNITIKKNRY                      | 78 |
| R3P73 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNRY                        | 79 |
| R3P74 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKKYLSIKKNRY                        | 80 |
| R3P75 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNITIKKNRY                      | 81 |
| R3P76 | HSDAVFTDNYTLRKOLAACKYLNITIKKNRY                      | 82 |
| R3P77 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLOSICKKKR                       | 83 |
| R3P78 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLSIKKKR                         | 84 |
| R3P79 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLSIKKNRY                        | 85 |
| R3P80 | HSDAVFTDNYTLRKQVAACKYLOSICKKKR                       | 86 |

|        |                               |     |
|--------|-------------------------------|-----|
| R3P81  | HSDAVFTDNYTLRKQVAVKKYLSIKKK   | 87  |
| R3P82  | HSDAVFTDNYTLRKQVAVKKYLSIKNKRY | 88  |
| R3P83  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILKKRY | 89  |
| R3P84  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILKKR  | 90  |
| R3P85  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILRK   | 91  |
| R3P86  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSIKNK   | 92  |
| R3P87  | HSDAVFTDNYTLRKQVAVKKYLSILKKRY | 93  |
| R3P88  | HSDAVFTDNYTLRKQVAVKKYLSILKKR  | 94  |
| R3P89  | HSDAVFTDNYTLRKQVAVKKYLSILKK   | 95  |
| R3P92  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILNKRY | 97  |
| R3P93  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILNKR  | 98  |
| R3P94  | HSDAVFTDNYTLRKQVAAKKYLSILNK   | 99  |
| R3P97  | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 100 |
| R3P98  | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 101 |
| R3P99  | HSDAVFTDNYTLRKQMAEKYLSIKNKR   | 102 |
| R3P100 | HSDAVFTDNYTLRKQMAFKYLSIKNKR   | 103 |
| R3P101 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 104 |
| R3P102 | HSDAVFTDNYTLRKQMAHKYLSIKNKR   | 105 |
| R3P103 | HSDAVFTDNYTLRKQMAIKYLSIKNKR   | 106 |
| R3P104 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 107 |
| R3P105 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 108 |
| R3P106 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 109 |
| R3P107 | HSDAVFTDNYTLRKQMANKKYLSIKNKR  | 110 |
| R3P108 | HSDAVFTDNYTLRKQMAPKKYLSIKNKR  | 111 |
| R3P109 | HSDAVFTDNYTLRKQMAQKKYLSIKNKR  | 112 |
| R3P110 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 113 |
| R3P111 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 114 |
| R3P112 | HSDAVFTDNYTLRKQMATKKYLSIKNKR  | 115 |
| R3P113 | HSDAVFTDNYTLRKQMAVKYLSIKNKR   | 116 |
| R3P114 | HSDAVFTDNYTLRKQMAWKYLSIKNKR   | 117 |
| R3P115 | HSDAVFTDNYTLRKQMAKKYLSIKNKR   | 118 |
| R3P116 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIANKR  | 119 |
| R3P117 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSICNKR  | 120 |
| R3P118 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIDNKR  | 121 |
| R3P119 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIENKR  | 122 |
| R3P120 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIFNKR  | 123 |
| R3P121 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIGNKR  | 124 |
| R3P122 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIHNKR  | 125 |
| R3P123 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIINKR  | 126 |
| R3P124 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIMNKR  | 127 |
| R3P125 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSINNKR  | 128 |
| R3P126 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIPNKR  | 129 |
| R3P127 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIQNKR  | 130 |
| R3P128 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIRNKR  | 131 |
| R3P129 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSISNKR  | 132 |
| R3P130 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSITNKR  | 133 |
| R3P131 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIVNKR  | 134 |
| R3P132 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIWNKR  | 135 |
| R3P133 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIYNKR  | 136 |
| R3P134 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNAR  | 137 |
| R3P135 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNCR  | 138 |
| R3P136 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNDR  | 139 |
| R3P137 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNER  | 140 |
| R3P138 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNFR  | 141 |
| R3P139 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNGR  | 142 |
| R3P140 | HSDAVFTDNYTLRKQMAAKKYLSIKNHR  | 143 |

|        |                                              |     |
|--------|----------------------------------------------|-----|
| R3P141 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNIR                | 144 |
| R3P142 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNLR                | 145 |
| R3P143 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNMR                | 146 |
| R3P144 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNHR                | 147 |
| R3P145 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNPR                | 148 |
| R3P146 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNOR                | 149 |
| R3P147 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNRR                | 150 |
| R3P148 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNSR                | 151 |
| R3P149 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNTR                | 152 |
| R3P150 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNVR                | 153 |
| R3P151 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNWR                | 154 |
| R3P152 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNYR                | 155 |
| R3P153 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKA                | 156 |
| R3P155 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKD                | 157 |
| R3P156 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKE                | 158 |
| R3P157 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKF                | 159 |
| R3P158 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKG                | 160 |
| R3P159 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKH                | 161 |
| R3P160 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKI                | 162 |
| R3P161 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKK                | 163 |
| R3P162 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKL                | 164 |
| R3P163 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKM                | 165 |
| R3P164 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKN                | 166 |
| R3P165 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKP                | 167 |
| R3P166 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKO                | 168 |
| R3P167 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKS                | 169 |
| R3P168 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKT                | 170 |
| R3P169 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKV                | 171 |
| R3P170 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKW                | 172 |
| R3P171 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKY                | 173 |
| R3P172 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKNKRYSWCEPGWCR      | 174 |
| R3P173 | HSDAVFTDDYTRLRKEVAAKKYLESIKDKRY              | 175 |
| PAC1   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 176 |
| PAC2   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 177 |
| PAC3   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 178 |
| PAC4   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 179 |
| PAC5   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 180 |
| PAC6   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 181 |
| PAC7   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 182 |
| PAC8   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 183 |
| PAC9   | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 184 |
| PAC10  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 185 |
| PAC11  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 186 |
| PAC12  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 187 |
| PAC13  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 188 |
| PAC14  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 189 |
| PAC15  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 190 |
| PAC16  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 191 |
| PAC17  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 192 |
| PAC18  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 193 |
| PAC19  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 194 |
| PAC20  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 195 |

|        |                                              |     |
|--------|----------------------------------------------|-----|
| PAC21  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVREYLA AVL-NH <sub>2</sub> | 196 |
| PAC22  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKKLA AVL-NH <sub>2</sub> | 197 |
| PAC23  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYKA AVL-NH <sub>2</sub> | 198 |
| PAC24  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLK AVL-NH <sub>2</sub> | 199 |
| PAC25  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAK VL-NH <sub>2</sub> | 200 |
| PAC26  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AKL-NH <sub>2</sub> | 201 |
| PAC27  | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLA AVK-NH <sub>2</sub> | 202 |
| R3P174 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIKNRI               | 322 |
| R3P175 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLNSIKNRI              | 323 |
| R3P176 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKKYLNSIKNRI              | 324 |
| R3P177 | HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIKNRI              | 325 |
| R3P178 | HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKKYLNSIKNRI             | 326 |
| R3P179 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIPNRI               | 327 |
| R3P180 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLNSIPNRI              | 328 |
| R3P181 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKKYLNSIPNRI              | 329 |
| R3P182 | HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIPNRI              | 330 |
| R3P183 | HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKKYLNSIPNRI             | 331 |
| R3P184 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIQNRI               | 332 |
| R3P185 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLNSIQNRI              | 333 |
| R3P186 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKKYLNSIQNRI              | 334 |
| R3P187 | HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIQNRI              | 335 |
| R3P188 | HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKKYLNSIQNRI             | 336 |
| R3P189 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNSIRNRI               | 337 |
| R3P190 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAGKKYLNSIRNRI              | 338 |
| R3P191 | HSDAVFTDNYTRLRKQMARKKKYLNSIRNRI              | 339 |
| R3P192 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKKYLNSIRNRI              | 340 |
| R3P193 | HSDAVFTDNYTRLRKQMASKKKKYLNSIRNRI             | 341 |

#### Ejemplo 8. Secreción de Insulina por islotes de ratas

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

Se aislaron islotes de rata y se los trató con GLP1 o R3P3 a una concentración de 3 o de 8 mM de glucosa en el medio de acuerdo con el protocolo de islotes de rata antes descripto en el Ejemplo 1. Como se ilustra en las Figuras 4A – 4B, el péptido R3P3 intensifica considerablemente la liberación de insulina de los islotes en forma dependiente de la concentración, y este efecto es similar al de GLP-1, un conocido secretagogo de insulina.

#### Ejemplo. Respuesta in vivo de la insulina y la glucosa

Como se demuestra más adelante en las Tablas 2 y 3, los polipéptidos que activan al receptor R3 también potencia el aumento en plasma inducido por la glucosa de los niveles insulínicos en comparación con la glucosa solamente. Este aumento de la insulina provoca un concomitante descenso de la glucosa en plasma.

De conformidad con el protocolo del Ejemplo 2 anteriormente expuesto, se anestesiaron ratas Wistar con ayuno durante la noche con pentobarbital; se las inyectó por vía i.v. con glucosa  $\pm$  péptido y se las sangró en los ojos perforación al cabo de 1 minuto. N = 12 ratas/ grupo. El gráfico de la figura 5 ilustra que el polipéptido R3P3 provoca un aumento de la eliminación de glucosa, que acompaña el aumento de la secreción de insulina. Se administró el péptido o vehículo i.v. seguido por una carga de glucosa administrada i.p. de acuerdo con el Ejemplo 3. Se siguió la glucosa plasmática durante todo el período indicado. Como se demuestra en el gráfico, R3P3 aceleró acentuadamente la eliminación de la glucosa en sangre.

#### Ejemplo 10. Efectos secundarios de Diarrea

Como se describiera anteriormente en el protocolo del Ejemplo 4, las ratas en ayunas fueron inyectadas s.c. con el péptido indicado (5 nmol/ kg o 22 – 24 nmol/kg). Cinco minutos después de la inyección, se dio 0,3 ml de agua por vía oral. Cinco minutos después de la dosis de agua, los animales fueron sacrificados y se determinó el contenido de agua en el intestino delgado. Como se ilustra en al Figura 6, las inyecciones de VIP a las dos dosis provocaron un marcado aumento del contenido de agua de la luz del intestino delgado con respecto al vehículo control (salina). A la dosis más elevada, los péptidos R3 sólo provocaron un muy pequeño aumento (es decir, en términos generales, 10 %) en comparación con VIP. A la dosis de 5 nmol/kg, los péptidos no

produjeron cambio alguno en el contenido de agua del intestino delgado. El grado de retención de agua se utilizó como índice de activación de R2 in vivo.

#### **Ejemplo 11. Efecto de los Péptidos sobre la Tolerancia a la Glucosa Intraperitoneal en Ratas**

Se forzó a ayunar a ratas Wistar y luego se las anestesió con Pentobarbital. Las ratas fueron sangradas por los ojos (hora cero) y se inyectó el péptido (en albúmina humana al 1 %) por vía subcutánea. Cinco minutos después, se inyectó 1 g/kg de glucosa (en salina) por vía intraperitoneal, y las ratas fueron sangradas por los ojos al cabo de 30 minutos. Se determinaron los niveles plasmáticos de glucosa utilizando el autoanalizador Axon, y los mismos aparecen en la Figura 7.

La Figura 7 demuestra que la glucosa en plasma se elevó a 160 mg/dl por encima de la basal (100 mg/dl) en ratas tratadas con el vehículo 30 minutos después del IPGTT (Prueba de Tolerancia a la Glucosa IP). En las ratas inyectadas con los péptidos R3P3, R3P12 y R3P13, esta elevación de la glucosa en plasma se redujo significativamente, comprobándose así el efecto productor de insulina. A razón de 1 nmol/kg s.c., el efecto reductor de glucosa de cada péptido fue similar al observado con una dosis equivalente de GLP-1.

#### **Ejemplo 2. Polipéptidos secretores de insulina dependiente de la glucosa**

La Tabla 2 contiene una lista de los péptidos que simulaban la liberación de insulina in vivo en el ensayo IPGTT, o in vitro por medio del análisis de los islotes de ratas. Como se manifiesta en los datos, los péptidos aumentan la liberación de insulina mediada por la glucosa tanto in vivo como in vitro.

Insulina plasmática: los datos se expresan en términos de % de insulina en plasma un minuto después del IVGTT (0,4 g/kg de glucosa) con salina, o bien con 0,1 nmol/kg de P51, P55, P60, P66 o 1 nmol/kg de los demás péptidos

en ratas Wistar. Se extrajo sangre de los ojos y se midió la insulina con el kit RIA de insulina de ratas (Linco Research, Inc., St. Charles, MO).

Glucosa en plasma: los datos se expresan en términos de % del área bajo la curva de vehículo de glucosa en plasma tras la IPGTT (1 g/kg de glucosa) tras el tratamiento con una dosis de 1 nmol/kg del péptido. Se ha informado que PACAP27 induce la secreción de insulina pero no afecta los niveles plasmáticos de glucosa (Filipsson, K. y otros, J. Clin. Endocrin & Metabolism 82: 3093 – 3098 (1997)). Los inventores de la presente han demostrado, por primera vez, que esto se debe a los efectos de R2 y R3 sobre la tendencia a la glucosa de cancelarse entre sí. El agonista selectivo de R2 (K15, R16, L27) VIP(1-7)/GRF(8.27) (Gourlet y otros, Peptides 18: 1539 – 45 (1997)), definido como R2P1, aumenta el nivel plasmático de glucosa en 14 % en tanto que los agonistas selectivos de R3 reducen el nivel plasmático de glucosa en ~ 20 %. Por lo tanto, la selectividad por R3 parece ser un atributo favorable para los medicamentos que han de ser empleados en la obtención de una reducción de glucosa en sangre, para el tratamiento de la diabetes de tipo 2.

Liberación de Insulina de los Islotes: Se aislaron islotes de ratas Sprague-Dawley de acuerdo con lo descrito en el Ejemplo 1 y se los trató con vehículo o con un péptido especificado (10 nM) por espacio de 2 h. Se midió la concentración de insulina en el medio con el kit RIA de insulina de ratas Linco. La concentración de glucosa en el medio era de 8 mM. Los datos se expresan en términos de % de [insulina] en 8 mM de glucosa sola. No se observaron aumentos de la concentración de insulina inducidos por los polipéptidos a razón de 3 mM de glucosa; por consiguiente, la actividad liberadora de insulina de estos polipéptidos depende de la glucosa.

Tabla 2

| Peptido | Insulina en Plasma<br>(% de Basal) | Glucosa en Plasma<br>(% de Basal) |      | Lib. Insulina lelelen<br>(% de Basal) |
|---------|------------------------------------|-----------------------------------|------|---------------------------------------|
|         |                                    | i.v.                              | s.c. |                                       |
| PACAP27 | 320                                |                                   |      |                                       |
| R2P1    | 216                                | 114                               |      | 188                                   |
| R3P0    |                                    | 77                                |      |                                       |
| R3P1    | 480                                | 73                                |      | 264                                   |
| R3P3    | 381                                | 77                                |      | 250                                   |
| R3P8    |                                    |                                   | 72   | 275                                   |
| R3P10   |                                    |                                   |      | 221                                   |
| R3P12   | 302                                |                                   |      | 174                                   |
| R3P13   | 485                                |                                   | 76   | 324                                   |
| R3P19   | 285                                |                                   | 77   | 170                                   |
| R3P38   | 255                                | 73                                | 78   |                                       |
| P51     | 258                                |                                   |      |                                       |
| P55     | 208                                |                                   |      |                                       |
| P60     | 283                                |                                   |      |                                       |
| R3P66   | 388                                |                                   | 82   | 184                                   |
| R3P77   | 388                                |                                   |      |                                       |
| R3P80   | 360                                |                                   |      |                                       |
| R3P81   | 302                                |                                   |      |                                       |

## Ejemplo 13. Composición Farmacéutica – Formulación IV

Se prepara una formulación inyectable estéril con 4 mg de un polipéptido de acuerdo con la SEC. ID. NO: 72 y 1 litro de salina estéril, utilizando un proceso de elaboración muy conocido en la técnica.

## Ejemplo 14. Composición Farmacéutica – Formulación IV

Se prepara una formulación inyectable estéril con 400 mg de un polipéptido de la SEC. ID. NO: 174 y 1 litro de salina estéril, utilizando un proceso de elaboración muy conocido en la técnica.

Ejemplo 15: Efecto de los agonistas peptídicos selectivos de los receptores PACAP27, VIP y PACAP sobre la frecuencia cardíaca en perros conscientes.

## Protocolo:

Se puso a perros Beagle en un cabestrillo, donde se los entrenó para que estuvieran de pie durante hasta 3 horas. Se colocó el puño del monitor de frecuencia cardíaca alrededor del rabo del perro.

Se inyectó salina en la vena caefálica y se monitoreó la frecuencia cardíaca cada 2 minutos para establecer una línea de base. Al cabo de 10 minutos, se inyectó el péptido y se monitoreó la frecuencia cardíaca cada 2 minutos durante los 20 minutos siguientes. Se trazó el área bajo la curva (ABC) para los primeros 10 minutos de cambio de frecuencia cardíaca inducido por el polipéptido en términos de % sobre la ABC del vehículo contra la concentración del polipéptido. PACAP27 y el agonista selectivo de R1 maxadilan (Moro, O., J. Biol. Chem. 272: 966 – 970 (1997)) poseen potencia similar en el aumento de la frecuencia cardíaca. VIP, que activa tanto R2 como R3 pero no R1, R2P1 selectivo de R2 y los agonistas selectivos de R3 R3P0, R3P3, R3P19, R3P36, R3P51 y R3P53 son por lo menos 10 veces menos potentes que PACAP27 o maxidilan. Por consiguiente, el efecto cardiovascular de PACAP27 se puede atribuir fundamentalmente a la activación de PACAP-R1. Todos Los péptidos son agonistas totales en sus respectivos receptores con afinidades comparables. R3P0 es el análogo de Roche RO 25-1553, que ha demostrado exhibir una selectividad por PACAP-R3 de por lo menos 100 veces con respecto a R1 y R2 (Gourlet y otros, Peptides 18: 4030408 (1997)).

#### Ejemplo 16 SPA con AMP cíclico

Se aplicaron células CHO que expresaban el PACAP R3 en placas de 96 receptáculos (Costar) a  $8 \times 10^4$  células por receptáculo y se las cultivó a 37°C durante 24 horas en  $\alpha$  MEM + nucleósidos + glutamina (Gibco BRL), 10 % de FBS, 100  $\mu$ g/ml de Pen/Estrep, 0,3 mg/ml de glutamina, 1 mM de HEPES, 0,5 mg/ml de Geneticina (Gibco BRL). Se retiraron los medios y se lavaron las placas con PBS. Las células fueron incubadas con un péptido, en Hepes-PBS-BSA con 0,4 mg/ml de inhibidor de tripsina de soja, 0,5 mg/ml de Bacitracina, 10  $\mu$ M de IBMX, durante 15 min. a 37°C. Se mantuvo en cuarentena el AMP cíclico en los extractos celulares utilizando el sistema de ensayo de

clasificación directa con cAMP SPA (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ). Los péptidos consignados en la Tabla 3 fueron analizados para determinar la actividad de cAMP.

La Tabla 3 da a conocer los resultados de SPA cAMP in vitro en células CHO transfectadas PACAP-R2 o PACAP-R3. La EC50 se define como la concentración del polipéptido a la cual se obtiene el 50 % de la actividad máxima de PACAP27. "NA" indica que no se detectaron actividades. La "Selectividad por R3" se obtiene de la relación de EC50 en R2 versus la EC50 a R3. Se designa a la mayoría de los siguientes polipéptidos sobre la base de VIP, que ha demostrado carecer de actividad en R1 (Vaudry D y otros, 2000, Pharmacological Reviews, 52: 269 -324). Por lo tanto, se cree que estos polipéptidos no poseen actividad apreciable en R1. Los péptidos designados sobre la base de VIP incluyen SEC. ID. NOS: 6 - 53, 62 - 65 y 70 - 175.

Tabla 3

| Péptido | Sec. ID NO | R2 EC50, nM | R3 EC50, nM | Selectividad R3 |
|---------|------------|-------------|-------------|-----------------|
| VIP     | 1          | 0.1         | 0.08        | 1.3             |
| R3P0    | 5          | >100        | 0.4         | >250            |
| R3P1    | 8          | >100        | 2           | >50             |
| R3P2    | 7          | >1000       | 3           | >300            |
| R3P3    | 8          | 100         | 0.75        | 130             |
| R3P5    | 10         | 200         | 7           | 30              |
| R3P8    | 11         | 2           | 1.4         | 1.5             |
| R3P9    | 12         | 40          | 2           | 20              |
| R3P10   | 13         | 3           | 11          | 0.3             |
| R3P11   | 14         | 10          | 3           | 3               |
| R3P12   | 15         | >100        | 0.5         | >200            |
| R3P13   | 16         | 163         | 5           | 33              |

|   |       |    |      |      |      |
|---|-------|----|------|------|------|
|   | R3P14 | 17 | 50   | 17   | 3    |
| → | R3P19 | 18 | 42   | 1.4  | 30   |
|   | R3P20 | 19 | 330  | 1.4  | 230  |
|   | R3P21 | 20 | 17   | 0.3  | 60   |
|   | R3P22 | 21 | 38   | 1.8  | 24   |
|   | R3P24 | 22 | 45   | 1.3  | 34   |
|   | R3P25 | 23 | 15   | 0.7  | 20   |
|   | R3P26 | 24 | >100 | 0.55 | >180 |
|   | R3P29 | 25 | >100 | 0.5  | >200 |
|   | R3P30 | 26 | 20   | 0.4  | 50   |
|   | R3P31 | 27 | >100 | 0.3  | >300 |
|   | R3P32 | 28 | 84   | 0.4  | 200  |
|   | R3P33 | 29 | >100 | 0.5  | >200 |
|   | R3P34 | 30 | >100 | 1.4  | >70  |
|   | R3P35 | 31 | >100 | 2.6  | >40  |
| → | R3P36 | 32 | >90  | 0.4  | >200 |
|   | R3P41 | 33 | 8    | 0.08 | 100  |
|   | R3P42 | 34 | 0.3  | 0.03 | 10   |
|   | R3P43 | 35 | 0.8  | 0.08 | 10   |
|   | R3P44 | 36 | 8    | 1.3  | 6    |
|   | R3P45 | 37 | NA   | NA   |      |
|   | R3P46 | 38 | 0.4  | 0.06 | 7    |
|   | R3P47 | 39 | 0.7  | 0.12 | 6    |
|   | R3P48 | 40 | 1    | 0.13 | 8    |
|   | R3P49 | 41 | 8    | 0.27 | 30   |
|   | R3P50 | 42 | 0.7  | 0.13 | 6    |
| → | R3P51 | 43 | 23   | 0.26 | 90   |
|   | R3P52 | 44 | >100 | 0.4  | >250 |
| → | R3P53 | 45 | 500  | 0.2  | 2500 |
| → | R3P54 | 46 | >100 | 0.5  | >200 |
| → | R3P55 | 47 | 60   | 0.17 | 280  |
|   | R3P56 | 48 | 40   | 0.4  | 100  |
|   | R3P57 | 49 | 42   | 0.23 | 190  |
| → | R3P58 | 50 | 55   | 0.32 | 170  |
|   | R3P59 | 51 | 10   | 0.15 | 70   |
| → | R3P60 | 52 | 120  | 1    | 120  |
|   | R3P61 | 53 | 110  | 0.8  | 140  |
|   | R3P6  | 57 | 220  | 80   | 3    |
|   | R3P7  | 58 | 2    | 4    | 0.5  |
|   | R3P15 | 59 | 12   | 5    | 2    |
|   | R3P16 | 60 | 14   | 10   | 1.4  |
|   | R3P17 | 61 | 8    | 4    | 2    |
|   | R3P18 | 62 | NA   | NA   |      |
|   | R3P23 | 63 | 10   | 0.43 | 23   |
|   | R3P27 | 64 | 6.4  | 0.8  | 8    |
|   | R3P28 | 65 | 8    | 7    | 1    |
| → | R3P37 | 66 | 71   | 4    | 18   |
|   | R3P38 | 67 | 17   | 2.3  | 7    |
|   | R3P39 | 68 | 1    | 0.5  | 2    |
|   | R3P40 | 69 | 1.4  | 0.7  | 2    |
|   | R3P82 | 70 | 180  | 1.8  | 100  |

|        |     |      |       |       |
|--------|-----|------|-------|-------|
| →R3P65 | 71  | 80   | 0.6   | 130   |
| →R3P66 | 72  | 100  | 0.4   | 250   |
| R3P67  | 73  | 100  | 0.3   | 330   |
| R3P68  | 74  | 130  | 0.5   | 260   |
| R3P69  | 75  | 90   | 0.5   | 190   |
| R3P70  | 76  | >100 | 0.4   | >250  |
| R3P71  | 77  | 58   | 0.08  | 880   |
| R3P72  | 78  | >100 | 0.18  | >800  |
| R3P73  | 79  | 50   | 0.3   | 170   |
| R3P74  | 80  | 90   | 0.6   | 150   |
| R3P75  | 81  | >150 | 0.3   | >500  |
| R3P76  | 82  | >150 | 0.1   | >1500 |
| →R3P77 | 83  | 200  | 0.4   | 500   |
| R3P78  | 84  | 250  | 1.1   | 230   |
| R3P79  | 85  | 100  | 0.5   | 200   |
| →R3P80 | 86  | 88   | 0.44  | 200   |
| →R3P81 | 87  | 50   | 0.5   | 100   |
| R3P82  | 88  | 10   | 0.4   | 23    |
| R3P83  | 89  | 5    | 0.08  | 60    |
| R3P84  | 90  | 2.5  | 0.08  | 40    |
| R3P85  | 91  | 5    | 0.18  | 30    |
| R3P86  | 92  | 90   | 0.8   | 110   |
| R3P87  | 93  | 0.6  | 0.2   | 3     |
| R3P88  | 94  | 0.9  | 0.08  | 12    |
| R3P89  | 95  | 0.9  | 0.08  | 15    |
| R3P92  | 98  | 2    | 0.02  | 100   |
| R3P93  | 98  | 6    | 0.14  | 40    |
| R3P94  | 98  | 8    | 0.09  | 100   |
| R3P98  | 101 | NA   | NA    |       |
| R3P98  | 102 | 40   | 1.0   | 40    |
| R3P100 | 103 | 10   | 0.3   | 30    |
| R3P101 | 104 | 400  | 1.0   | 400   |
| R3P102 | 105 | 300  | 60.0  | 5     |
| R3P103 | 106 | 0.4  | 0.05  | 8     |
| R3P104 | 107 | 100  | 0.2   | 500   |
| R3P105 | 108 | 1    | 0.3   | 3     |
| R3P106 | 109 | 2    | 0.1   | 20    |
| R3P107 | 110 | 1000 | 200.0 | 5     |
| R3P108 | 111 | 1000 | 300.0 | 3     |
| R3P109 | 112 | 1000 | 10.0  | 100   |
| R3P110 | 113 | 100  | 0.5   | 200   |
| R3P111 | 114 | 1000 | 3.0   | 300   |
| R3P112 | 115 | 4    | 0.1   | 40    |
| R3P113 | 116 | 3    | 0.3   | 10    |
| R3P114 | 117 | 20   | 2.0   | 10    |
| R3P115 | 118 | 300  | 6.0   | 50    |
| R3P116 | 119 | 20   | 1.0   | 20    |
| R3P118 | 121 | 15   | 0.5   | 30    |
| R3P119 | 122 | 15   | 0.5   | 30    |
| R3P120 | 123 | 10   | 0.2   | 50    |
| R3P121 | 124 | 50   | 1.0   | 50    |

|        |     |     |      |     |
|--------|-----|-----|------|-----|
| R3P122 | 125 | 10  | 0.2  | 50  |
| R3P123 | 126 | 5   | 0.1  | 50  |
| R3P124 | 127 | 3   | 0.2  | 15  |
| R3P125 | 128 | 60  | 2.0  | 30  |
| R3P126 | 129 | 200 | 1.0  | 200 |
| R3P127 | 130 | 300 | 0.5  | 600 |
| R3P128 | 131 | 80  | 0.3  | 200 |
| R3P129 | 132 | 50  | 1.0  | 50  |
| R3P130 | 133 | 40  | 1.0  | 40  |
| R3P131 | 134 | 20  | 0.3  | 70  |
| R3P132 | 135 | 10  | 0.2  | 50  |
| R3P133 | 136 | 8   | 0.1  | 80  |
| R3P134 | 137 | 40  | 0.4  | 100 |
| R3P135 | 139 | 20  | 0.3  | 70  |
| R3P137 | 140 | 30  | 0.3  | 100 |
| R3P139 | 142 | 20  | 0.4  | 60  |
| R3P140 | 143 | 15  | 0.3  | 50  |
| R3P141 | 144 | 20  | 0.2  | 100 |
| R3P142 | 145 | 8   | 0.2  | 30  |
| R3P143 | 146 | 8   | 0.2  | 30  |
| R3P144 | 147 | 300 | 3.0  | 100 |
| R3P145 | 148 | 50  | 0.5  | 100 |
| R3P146 | 149 | 30  | 0.3  | 100 |
| R3P147 | 150 | 100 | 0.2  | 500 |
| R3P148 | 151 | 30  | 0.3  | 100 |
| R3P149 | 152 | 40  | 0.5  | 80  |
| R3P150 | 153 | 40  | 0.8  | 50  |
| R3P153 | 158 | 40  | 0.2  | 200 |
| R3P155 | 157 | 40  | 0.4  | 100 |
| R3P156 | 158 | 100 | 1.0  | 100 |
| R3P157 | 159 | 50  | 0.3  | 170 |
| R3P158 | 160 | 6   | 0.07 | 80  |
| R3P159 | 161 | 200 | 0.6  | 400 |
| R3P160 | 162 | 100 | 0.2  | 500 |
| R3P161 | 163 | 60  | 0.2  | 300 |
| R3P162 | 164 | 20  | 0.1  | 200 |
| R3P163 | 165 | 40  | 0.2  | 200 |
| R3P164 | 166 | 100 | 0.3  | 300 |
| R3P165 | 167 | 150 | 0.5  | 300 |
| R3P166 | 168 | 50  | 0.1  | 500 |
| R3P167 | 169 | 300 | 1.0  | 300 |
| R3P168 | 170 | 60  | 0.2  | 300 |
| R3P169 | 171 | 60  | 0.2  | 300 |
| R3P170 | 172 | 20  | 0.1  | 200 |
| R3P171 | 173 | 80  | 0.4  | 200 |
| R3P172 | 174 | 77  | 2.6  | 29  |
| R3P173 | 175 | NA  | 200  |     |
| PAC1   | 176 | 970 | 10   | 97  |
| PAC2   | 177 | NA  | 34   |     |
| PAC3   | 178 | NA  | NA   |     |
| PAC4   | 179 | 45  | 7    | 6   |

|         |     |      |      |     |
|---------|-----|------|------|-----|
| PAC5    | 180 | 1.8  | 0.7  | 2   |
| PAC6    | 181 | NA   | NA   |     |
| PAC7    | 182 | NA   | NA   |     |
| PAC8    | 183 | 43   | 47   | 1   |
| PAC9    | 184 | 0.9  | 0.7  | 1   |
| PAC10   | 185 | 110  | 27   | 4   |
| PAC11   | 186 | 10   | 140  | 0.1 |
| PAC12   | 187 | 150  | 3    | 50  |
| PAC13   | 188 | 3    | 0.5  | 6   |
| PAC14   | 189 | 110  | 1.8  | 70  |
| PAC15   | 190 | 2.4  | 0.2  | 12  |
| PAC16   | 191 | 0.2  | 0.2  | 1   |
| PAC17   | 192 | 0.25 | 0.15 | 1.8 |
| PAC18   | 193 | 0.7  | 1.1  | 0.7 |
| PAC19   | 194 | 8    | 0.4  | 20  |
| PAC20   | 195 | 20   | 0.7  | 30  |
| PAC21   | 196 | 2.5  | 0.24 | 10  |
| PAC22   | 197 | 2    | 19   | 0.1 |
| PAC23   | 198 | 170  | 13   | 13  |
| PAC24   | 199 | 0.3  | 0.2  | 1.5 |
| PAC25   | 200 | 0.13 | 0.04 | 3   |
| PAC26   | 201 | 0.25 | 0.3  | 1   |
| PAC27   | 202 | 1.5  | 1.1  | 1.4 |
| rR3P174 | 322 | 18   | 0.20 | 90  |
| rR3P175 | 323 | 400  | 2.2  | 180 |
| rR3P176 | 324 | 300  | 2.0  | 150 |
| rR3P177 | 325 | 110  | 1.8  | 70  |
| rR3P178 | 326 | 80   | 0.75 | 110 |
| rR3P179 | 327 | 230  | 1.5  | 150 |
| rR3P180 | 328 | >100 | 8.7  | >20 |
| rR3P181 | 329 | 280  | 5.1  | 50  |
| rR3P182 | 330 | 280  | 3.2  | 90  |
| rR3P183 | 331 | >150 | 5.4  | >30 |
| rR3P184 | 332 | 10   | 0.37 | 30  |
| rR3P185 | 333 | 180  | 4.5  | 40  |
| rR3P186 | 334 | 70   | 1.6  | 44  |
| rR3P187 | 335 | >130 | 1.6  | >80 |
| rR3P188 | 336 | 150  | 2.2  | 70  |
| rR3P189 | 337 | 1.3  | 0.04 | 30  |
| rR3P190 | 338 | 220  | 2.2  | 100 |
| rR3P191 | 339 | >200 | 2.7  | >80 |
| rR3P192 | 340 | 40   | 0.60 | 60  |
| rR3P193 | 341 | 200  | 1.9  | 110 |

#### Ejemplo 17. Producción de anticuerpos policlonales

Se ejecutó la síntesis del péptido Ac-CRKQVAAKKYLQSIKNKRY COOH en un sintetizador de péptidos de Applied Biosystems 430A empleando química

de fmoc con activación de aminoácidos por HBTU. Se escindió el péptido empleando un cocktail de 84,6 % de TFA, 4,4 % de fenol, 4,4 % de agua, 4,4 % de tioanisol y 2,2 % de etanditiol. El péptido crudo fue purificado utilizando una columna de fase inversa C18 con un gradiente de TFA al 0,1 %/ $\text{CH}_3\text{CN}$ . Se realizó la evaluación del lote en un espectrómetro de masas PerSeptive V Biosystems Voyager DE Pro MALDI. Se acopló el residuo de cisteína a KLH utilizando el kit y el protocolo de mKLH activado con Maleimida Pierce Inject (Pierce, Rockford, IL). Se inmunizó a conejos utilizando el siguiente plan de inmunización con antisuero policlonal:

Día 0 – 10 ml de presangrado para determinar el suero basal

250  $\mu\text{g}$  de cada péptido en 1 ml de emulsión de Adyuvante Completo de Freund,

0,1 ml/sitio x 10 sitios por vía subcutánea

Día 14 – Refuerzo con 250  $\mu\text{g}$  de cada péptido en 1 ml de emulsión de Adyuvante Completo de Freund,

0,1 ml/sitio x 10 sitios por vía subcutánea

Día 21 – 35 ml de sangrado

Día 35 - Refuerzo con 250  $\mu\text{g}$  de cada péptido en 1 ml de emulsión de Adyuvante Completo de Freund,

0,1 ml/sitio x 10 sitios por vía subcutánea

Día 42 - 35 ml de sangrado

Día 56 - Refuerzo con 250  $\mu\text{g}$  de cada péptido en 1 ml de emulsión de Adyuvante Completo de Freund,

0,1 ml/sitio x 10 sitios por vía subcutánea

Día 63 – 35 ml de sangrado

Día 77 - Refuerzo con 250  $\mu\text{g}$  de cada péptido en 1 ml de emulsión de Adyuvante Completo de Freund,

0,1 ml/sitio x 10 sitios por vía subcutánea

**Día 84 – Sangrado final**

Los anticuerpos fueron caracterizados utilizando el siguiente protocolo:

Se revistió una placa Immulon III (DYNATECH LABORATORIES, INC., Chantilly, Virginia) con péptido P66 (rango de 0,3 – 100 ng) en 100 µl de buffer de revestimiento EIA, 1,6 l de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M + 0,4 l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M, pH 9,5) por espacio de 3 horas a temperatura ambiente (TA). Se pintó la placa con 10 µl de leche al 5 %, TBS- Tween 20 (10 mM de Tris pH 8,0, 150 mM de NaCl, 0,05 % de Tween 20 (SIGMA P-1379) durante 1 hora a TA y se la lavó 3 veces con TBS Tween. Se introdujo en el receptáculo el anticuerpo R3P66 en 100 µl de "bloto" al 5 % (TBS-Tween 20 + leche al 5 %) durante 2 horas a temperatura ambiente seguido por lavado con TBS Tween (repetir el lavado 5 veces). Se agregó el anticuerpo secundario (conjugado de Fosfatasa Alcalina de conejo anti ratón de BioRad) al receptáculo en una dilución de 1:1000 en 100 µl de "bloto" al 5 % durante 1 hora. Se lavó la placa 5 veces con TBS Tween, Fosfato de p-Nitrofenilo (SIGMA 104 – 105), 0,5 mg/ml de buffer de sustrato (Dietanolamina 1 M, 0,5 µM de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, pH 9,7 c/ HCl) en 100 µl y se incubó a RA durante 1 hora hasta O/N. Se leyó la placa a una DO de 405 en SPECTRAMax 250 (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA).

Para determinar si los anticuerpos producían en conejos contra el péptido Ac-CRKQVAAKKYLQSIKNKRY-COOH de acuerdo con el Ejemplo 17 reconocían al péptido R3P66 (SEC. ID. NO: 72), se realizó el ensayo enzimático de inmunoabsorbencia (ELISA). Cuando los anticuerpos reconocen un péptido, se detecta una señal a DO405. La figura demuestra que estos anticuerpos reconocen a R3P66 pero no interactúan con los péptidos homólogos PACAP-27 o VIP hasta una concentración del péptido de 30 µg.

### **Ejemplo 18: Hipersensibilidad de las vías aéreas en un Modelo de Asma Aguda en Primates**

Se mantuvo a los monos cinomolgus machos (*Macaca fascicularis*) empleados en este estudio a temperatura y humedad constantes, con un ciclo de luz de doce horas. Se los alimentaba dos veces por día, excepto el día del ensayo en que se retuvo la comida la noche antes del procedimiento. Se dio agua a voluntad en todo momento.

Se midió la hipersensibilidad (AHR) de las vías aéreas (línea de base) 1 semana antes del desafío con antígeno control (sin tratamiento) y una vez más 24 horas después del desafío con el antígeno. Se midió la hipersensibilidad de las vías aéreas inducida por antígenos mediante una caída de la PC<sub>100</sub> (la concentración de metacolina necesaria para provocar un aumento de 100 % de resistencia pulmonar) a las 24 h, en comparación con la línea de base. Después de 2 semanas de reposo, se realizó otra determinación de AHR basal. Una semana más tarde, se administraron los péptidos de la presente invención en forma de aerosol, 10 minutos antes del desafío con el antígeno. A las 24 horas, se midió una vez más la AHR, y se comparó la caída de PC<sub>100</sub> con tratamiento con la obtenida sin tratamiento.

**Procedimiento Experimental:** El día de cada experimento, se anestesió a los animales con una mezcla de ketamina/xilazina (70,12 mg kg<sup>-1</sup> @ 0,1 ml kg<sup>-1</sup>) cuando aún se encontraban en su jaula. Una vez inconscientes, se los llevó al laboratorio de primates, donde fueron colocados en posición supina sobre una manta de aire caliente sobre una mesa rodante. Se frotó un ungüento oftálmico sobre cada ojo, y se roció 0,2 ml de lidocaína (2 %) sobre la laringe y la parte posterior de la tráquea. Las mandíbulas se mantuvieron separadas por medio de un separador de mandíbulas y se insertó un tubo endotraqueal con mango de 5,0 de calibre (con el extremo untado generosamente con gel de xilocaína, 2

%) con la ayuda de un laringoscopio. Luego se colocó al animal en una silla de seguridad especialmente diseñada de manera que el animal estuviera ligeramente reclinado, aunque en posición vertical de asiento, asegurado por un collar en el cuello. Una manta hidrotérmica rodeaba al animal.

Se conectó el tubo endotraqueal a un ventilador Harvard ajustado para producir 30 a 35 respiraciones por minuto. Se midió el flujo aéreo por medio de un neumotacógrafo Fleisch y se midió la presión torácica por medio de un transductor de presión validyne (como diferencia entre la presión en el extremo distal del tubo y la presión ambiente).

Se conectó el neumotacógrafo y validyne a un preamplificador y luego en un analizador respiratorio Mi<sup>2</sup>. Empleando las señales de flujo y presión primarias, el analizador computó la resistencia y elasticidad de las vías aéreas (así como un número de parámetros respiratorios más). Se llevó a cabo una medición inicial de 5 – 6 minutos para garantizar que las señales fueran constantes y que los valores de resistencia y elasticidad estuvieran dentro de límites reconocidos.

**Desafío con antígeno:** Este consistió en un desafío por inhalación con *Ascaris suum*. El extracto de *Ascaris suum* provisto fue diluido diez veces con PBS para dar una solución de 1000 µg/ml. Se administró el aerosol con un nebulizador de goteo Rainbow a presión (Puritan-Bennett) conectado a un respirador Bird mark 7A, ajustado para aportar 15 respiraciones por minuto. Se administraron 30 respiraciones de antígeno, tras lo cual se monitoreó la broncoconstricción por espacio de 15 min.

Una vez finalizado el desafío, se desconectó al animal del ventilador y cuando pudo respirar por sí solo se lo liberó de la silla de seguridad y se lo colocó sobre la mesa rodante en posición supina. Cuando hubo recuperado los

reflejos normales (pestañeo, deglución) junto con el tono muscular en los miembros, se restituyó el animal a su jaula.

**Administración del péptido:** Los péptidos en evaluación fueron administrados por inhalación del mismo modo anterior. Se diluyeron soluciones base de los péptidos con agua estéril para obtener una concentración de 0,5 ug/4 ul. De las mediciones anteriores se había revelado que el nebulizador administraba 4ul/inhalación, y el número de inhalaciones administradas a cada animal fue ajustado para administrar la concentración final correcta con el nebulizador. Para cada péptido, la concentración final administrada es la siguiente:

R3P0 (SEC. ID. NO: 5) – 0,6 ug/kg

R3P76 (SEC. ID. NO: 82) – 3 ug/kg

R2P82 (SEC. ID. NO: 88) – 1,8 ug/kg

**Desafío con metacolina:** Se llevaron a cabo curvas de respuesta a la dosis de metacolina para evaluar la hipersensibilidad de las vías respiratorias. En el modelo agudo, esto se midió a +24 horas y se comparó con el nivel de respuesta obtenido 7 días antes del tratamiento. Se administró un aerosol de salina con buffer de fosfato (PBS) utilizando un nebulizador como en el Ejemplo anterior. Se administró el aerosol para 15 inhalaciones y luego se monitoreó la resistencia pulmonar durante 10 minutos.

Se preparó la metacolina (Sigma) en una concentración de 100 mg/ml en PBS y esta solución base fue diluida con PBS a un rango de concentraciones finales de 0,1 mg/ml a 100 mg/ml inclusive. Se administró la metacolina (0,1 mg/ml, 15 inhalaciones) seguida por otros 10 minutos de monitoreo. Se administraron dosis sucesivas de metacolina aumentando la dosis en medio log. a cada paso hasta que la resistencia pulmonar se hubo duplicado o bien hasta que se hubo administrado la dosis máxima de metacolina (100 mg/ml).

Se tomó la línea de base (cero %) de resistencia como resistencia alcanzada después de la administración de PBS. El aumento de la resistencia pulmonar (%) y las dosis de metacolina fueron consignadas en una planilla y se calculó la PC<sub>100</sub> (la dosis de metacolina que provoca un aumento de la resistencia de 100 %) a partir de un gráfico de dosis contra resistencia. Estos valores fueron convertidos a valores logarítmicos<sub>10</sub>. Se comparó la PC<sub>100</sub> delta (valor +24 horas – valor línea de base) para el estudio con tratamiento con el del estudio con control.

La Tabla 4 ilustra los datos de PC<sub>100</sub> para los tres péptidos. Como se demuestra en los datos, los péptidos son eficaces contra la hipersensibilidad de las vías aéreas inducida por antígenos y por consiguiente pueden constituir una terapia potencial contra el asma.

Tabla 4 – Datos de PC<sub>100</sub> para los tres estudios con péptidos

| 1,8 ug/kg)                                | Péptido (dosis)  |             |                   |             |         |             |
|-------------------------------------------|------------------|-------------|-------------------|-------------|---------|-------------|
|                                           | R3P0 (0,6 ug/mg) |             | R3P76 (3,0 ug/kg) |             | R3P82   |             |
| Delta log <sub>10</sub> PC <sub>100</sub> | Control          | Tratamiento | Control           | Tratamiento | Control | Tratamiento |
| N                                         | 4                | 4           | 5                 | 5           | 4       | 4           |
| Media* 0,067                              | -0,325           | -0,150      | -0,468            | +0,047      |         | -0,567      |
| SD                                        | 0,177            | 0,152       | 0,128             | 0,253       | 0,361   | 0,329       |
| P (Trat. vs. Control)                     |                  | 0,240       |                   | 0,031       |         | 0,087       |
| % Inhibición de AHR Inducida              |                  | 54          |                   | 100         |         | 88          |

\* Cuando mayor es el valor negativo, más crece la respuesta excesiva del animal.

Todas las publicaciones y patentes mencionadas en la memoria descriptiva que antecede se incorporan a la presente como referencia. Los

expertos en la técnica considerarán evidentes las diversas modificaciones y variaciones de las composiciones descritas, así como los métodos de la presente invención, sin apartarse del alcance y espíritu de la invención. Si bien se ha descrito la invención en conexión con las realizaciones preferidas, se debe entender que la invención reivindicada no debe limitarse indebidamente a tales realizaciones específicas. Por cierto, se pretende que las diversas modificaciones de las modalidades descritas para llevar a la práctica la invención, que son evidentes para los expertos en el campo de la biología molecular o campos relacionados caigan dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Los expertos en la técnica sabrán reconocer, o podrán dilucidar, utilizando sólo experimentación de rutina, los numerosos equivalentes de las realizaciones específicas de la invención aquí descrita. Tales equivalentes deben considerarse abarcados por las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC. ID NOS: 11 a 14, SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NOS: 21 a 26, SEC. ID. NOS 32 a 36, SEC. ID. NOS: 40 a 53, SEC. ID. NOS: 57 a 61, SEC. ID. NOS: 63 a 99, SEC. ID. NOS: 102 a 119, SEC. ID. NOS: 121 a 137, SEC. ID. NOS: 139 a 177, SEC. ID. NOS: 179, 180, SEC. ID. NOS: 183 a 202, SEC. ID. NOS: 322 a 341 y los fragmentos, derivados y variantes de los mismos.
2. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1, o una variante degenerada del mismo.
3. Un vector que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2.
4. Una célula huésped que comprende un vector de acuerdo con la reivindicación 3.
5. Un método para producir un polipéptido, que comprende:
  - a) cultivar la célula huésped de acuerdo con la reivindicación 4 en condiciones adecuadas para la expresión de dicho polipéptido y
  - b) recuperar el polipéptido del cultivo de células huésped.
6. Una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una composición para terapia génica que comprende un polinucleótido de acuerdo con la reivindicación 2 en combinación con un vector de terapia génica terapéuticamente efectivo.
8. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 18.
- 9 El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 32. /

} cual es el  
vector  
correcto  
múltiples  
posibilidades

10. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 43. /

11. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 45.

12. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 47. /

13. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 50.

14. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 52. /

15. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 71.

16. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 72. /

17. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 83. /

18. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 86. /

19. El polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 en el cual dicho polipéptido está representado por SEC. ID. NO: 87. /

20. Un método para tratar un trastorno metabólico en un mamífero que comprende la administración a dicho mamífero de una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NO: 32, SEC. ID. NO: 43, SEC. ID. NO: 45, SEC. ID. NO: 47, SEC. ID. NO: 50, SEC. ID. NO: 52, SEC. ID. NO: 71, SEC. ID. NO: 72, SEC. ID. NO: 83, SEC. ID. NO: 86 y SEC. ID. NO: 87.

Excep

21. El método de acuerdo con la reivindicación 20 en el cual dicho trastorno metabólico es la diabetes de tipo 2.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 20 en el cual dicha cantidad terapéuticamente efectiva oscila entre aproximadamente 0,1 ug/kg a aproximadamente 1 mg/kg.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 20 en el cual dicho trastorno metabólico es el estado prediabético de tolerancia a la glucosa deteriorada.

24. Una variante del péptido intestinal vasoactivo que tiene una de las estructuras de la Figura 1, y los equivalentes funcionales de la misma.

25. Un método para estimular la liberación de insulina en forma dependiente de la glucosa en un mamífero que lo necesita mediante la administración a dicho mamífero de un polipéptido seleccionado entre el grupo que consiste en los polipéptidos de la figura 1.

26. Un método para tratar el asma en un mamífero, que comprende administrar a dicho mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un péptido seleccionado entre el grupo que consiste en SEC. ID. NO: 18, SEC. ID. NO: 32, SEC. ID. NO: 43, SEC. ID. NO: 45, SEC. ID. NO: 47, SEC. ID. NO: 50, SEC. ID. NO: 52, SEC. ID. NO: 71, SEC. ID. NO: 72, SEC. ID. NO: 83, SEC. ID. NO: 86 y SEC. ID. NO: 87.

27. Un anticuerpo purificado que se liga específicamente al polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1.

### Resumen

Esta invención presenta novedosos péptidos que funcionan in vivo para estimular la liberación de insulina de las células beta pancreáticas en forma dependiente de la glucosa. Se ha demostrado que estos péptidos secretagogos de insulina estimulan la liberación de insulina en las células de islotes de ratas in vitro e in vivo. Los péptidos de la presente invención proporcionan una nueva terapia para pacientes con secreción de insulina disminuida, en especial diabéticos de tipo 2. En especial, la invención es un polipéptido seleccionado entre un grupo específico de polipéptidos relacionados con VIP/PACAP, o equivalentes funcionales del mismo. La invención se refiere asimismo a un método para tratar una enfermedad metabólica en un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de los péptidos secretagogos de insulina a dicho mamífero. También se describen métodos para preparar los péptidos, tanto recombinantes como sintéticos.

|    |       |   |                                                     | SEQ. | ID NO. |
|----|-------|---|-----------------------------------------------------|------|--------|
|    | R3P8  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK-NH <sub>2</sub>         | 28   | 11     |
| 5  | R3P9  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKGGT                      | 31   | 12     |
|    | R3P10 | 1 | HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNLDLNGGT                     | 31   | 13     |
|    | R3P11 | 1 | HSDAVFTDNYTKLRKQLAAKKYLNLDLNGGT                     | 31   | 14     |
|    | R3P19 | 1 | HSDAVFTENYTKLRKQLAAKKYLNLDLKKGGTSWCEPGWCR           | 39   | 18     |
|    | R3P22 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLSIKKGGT                      | 31   | 21     |
| 10 | R3P24 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLDKNGGT                     | 31   | 22     |
|    | R3P25 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLSIKKGGT                      | 31   | 23     |
|    | R3P28 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKGGT                      | 31   | 24     |
|    | R3P29 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNLDKNGGT                     | 31   | 25     |
|    | R3P30 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLSIKKGGT                      | 31   | 26     |
| 15 | R3P36 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLDIKKKRY                    | 31   | 32     |
|    | R3P41 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK                         | 28   | 33     |
|    | R3P42 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK                         | 28   | 34     |
|    | R3P43 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKK                         | 28   | 35     |
|    | R3P44 | 1 | HSDAVFTDNYTELRKQMAVKKYLSIKK                         | 28   | 36     |
| 20 | R3P48 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNLDILN                       | 28   | 40     |
|    | R3P49 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKK                         | 28   | 41     |
|    | R3P50 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKK                         | 28   | 42     |
|    | R3P51 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKK                         | 28   | 43     |
|    | R3P52 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKKRY                      | 31   | 44     |
| 25 | R3P53 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKKR                       | 30   | 45     |
|    | R3P54 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKK                        | 29   | 46     |
|    | R3P55 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKNKRY                     | 31   | 47     |
|    | R3P56 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKKRY                      | 31   | 48     |
|    | R3P57 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKKR                       | 30   | 49     |
| 30 | R3P58 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKK                        | 29   | 50     |
|    | R3P59 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLSIKKNKRY                     | 31   | 51     |
|    | R3P60 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAKKYLSIKK                          | 28   | 52     |
|    | R3P61 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQIAAKKYLOTIKK                        | 28   | 53     |
|    | R3P6  | 1 | HSDGIFTESYSRYRKQMAVKKYLAALKKKRYKQRVKNK              | 38   | 57     |
| 35 | R3P7  | 1 | HSDAVFTENYTRLRKQMAVKKYLSIKK-NH <sub>2</sub>         | 28   | 58     |
|    | R3P15 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLSAVRHGGT-NH <sub>2</sub>     | 31   | 59     |
|    | R3P16 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKQGGT-NH <sub>2</sub>     | 31   | 60     |
|    | R3P17 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKYLAAVRHG-NH <sub>2</sub> | 38   | 61     |
|    | R3P23 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLDLKKGGT                    | 31   | 63     |
| 40 | R3P27 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLDLNGGT                     | 31   | 64     |
|    | R3P26 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAVKKYLNLDLKKGGT                    | 31   | 65     |
|    | R3P37 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKKGGT                     | 31   | 66     |
|    | R3P38 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQLAAKKYLADVKK                        | 28   | 67     |
|    | R3P39 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQLAVKKYLAAVKK                        | 28   | 68     |
| 45 | R3P40 | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVKK                        | 28   | 69     |
|    | R3P62 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAKKYLSIKK                          | 28   | 70     |
|    | R3P65 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKNKRY                     | 30   | 71     |
|    | R3P66 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAKKYLSIKKNKRY                      | 31   | 72     |
|    | R3P67 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQLAAKKYLNLDIKKNKRY                   | 31   | 73     |
| 50 | R3P68 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAKKYLSIKKNKRY                      | 31   | 74     |
|    | R3P69 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLSIKKNKRY                     | 31   | 75     |
|    | R3P70 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLDIKKNKRY                   | 31   | 76     |
|    | R3P71 | 1 | HSDAVFTDQYTRLRKQMAAKKYLSIKKNKRY                     | 31   | 77     |
|    | R3P72 | 1 | HSDAVFTDQYTRLRKQLAAKKYLNLDIKKNKRY                   | 31   | 78     |
| 55 | R3P73 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAHRYLSIKKNKRY                     | 31   | 79     |
|    | R3P74 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKHYLSIKKNKRY                     | 31   | 80     |
|    | R3P75 | 1 | HSDAVFTDQYTRLRKQLAAHYLNLDIKKNKRY                    | 31   | 81     |
|    | R3P76 | 1 | HSDAVFTDQYTRLRKQLAAHYLNLDIKKNKRY                    | 31   | 82     |
|    | R3P77 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAKKYLSIKKKR                        | 30   | 83     |

3053CIP2

|    |        |   |                                |    |     |
|----|--------|---|--------------------------------|----|-----|
|    | R3P78  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKKKR  | 30 | 84  |
|    | R3P79  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKNKRY | 31 | 85  |
|    | R3P80  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSIKKKR  | 30 | 86  |
|    | R3P81  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSIKKK   | 29 | 87  |
| 5  | R3P82  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSIKNKRY | 31 | 88  |
|    | R3P83  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILKKRY | 31 | 89  |
|    | R3P84  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILKKR  | 30 | 90  |
|    | R3P85  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILKK   | 29 | 91  |
|    | R3P86  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSIKNK   | 29 | 92  |
| 10 | R3P87  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSILKKRY | 31 | 93  |
|    | R3P88  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSILKKR  | 30 | 94  |
|    | R3P89  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSILKK   | 29 | 95  |
|    | R3P91  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAVKKYLSIKNK   | 29 | 96  |
|    | R3P92  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILNKRY | 31 | 97  |
| 15 | R3P93  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILNKR  | 30 | 98  |
|    | R3P94  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQVAAKKYLSILNK   | 29 | 99  |
|    | R3P99  | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAEKKYLSIKNKR  | 30 | 102 |
|    | R3P100 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLSIKNKR  | 30 | 103 |
|    | R3P101 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 104 |
| 20 | R3P102 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAHKKYLSIKNKR  | 30 | 105 |
|    | R3P103 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAIKKYLSIKNKR  | 30 | 106 |
|    | R3P104 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLSIKNKR  | 30 | 107 |
|    | R3P105 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 108 |
|    | R3P106 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 109 |
| 25 | R3P107 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 110 |
|    | R3P108 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAFKKYLSIKNKR  | 30 | 111 |
|    | R3P109 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 112 |
|    | R3P110 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 113 |
|    | R3P111 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 114 |
| 30 | R3P112 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 115 |
|    | R3P113 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 116 |
|    | R3P114 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 117 |
|    | R3P115 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 118 |
|    | R3P116 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIKNKR  | 30 | 119 |
| 35 | R3P118 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 121 |
|    | R3P119 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 122 |
|    | R3P120 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 123 |
|    | R3P121 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 124 |
|    | R3P122 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 125 |
| 40 | R3P123 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 126 |
|    | R3P124 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 127 |
|    | R3P125 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 128 |
|    | R3P126 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 129 |
|    | R3P127 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 130 |
| 45 | R3P128 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 131 |
|    | R3P129 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 132 |
|    | R3P130 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 133 |
|    | R3P131 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 134 |
|    | R3P132 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 135 |
| 50 | R3P133 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 136 |
|    | R3P134 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 137 |
|    | R3P136 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 139 |
|    | R3P137 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 140 |
|    | R3P138 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 141 |
| 55 | R3P139 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 142 |
|    | R3P140 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 143 |
|    | R3P141 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 144 |
|    | R3P142 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 145 |
|    | R3P143 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAKKKYLSIDNKR  | 30 | 146 |

|    |         |   |                                             |    |     |
|----|---------|---|---------------------------------------------|----|-----|
|    | rR3P144 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNNR             | 30 | 147 |
|    | rR3P145 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNPR             | 30 | 148 |
|    | rR3P146 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNQR             | 30 | 149 |
| 5  | rR3P147 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRR             | 30 | 150 |
|    | rR3P148 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNSR             | 30 | 151 |
|    | rR3P149 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNTR             | 30 | 152 |
|    | rR3P150 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNVR             | 30 | 153 |
|    | rR3P151 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNWR             | 30 | 154 |
| 10 | rR3P152 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNYR             | 30 | 155 |
|    | rR3P153 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKA             | 30 | 156 |
|    | rR3P154 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKD             | 30 | 157 |
|    | rR3P155 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKE             | 30 | 158 |
|    | rR3P156 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKF             | 30 | 159 |
|    | rR3P157 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKG             | 30 | 160 |
| 15 | rR3P158 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKH             | 30 | 161 |
|    | rR3P159 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKI             | 30 | 162 |
|    | rR3P160 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKK             | 30 | 163 |
|    | rR3P161 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKL             | 30 | 164 |
|    | rR3P162 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKM             | 30 | 165 |
| 20 | rR3P163 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKN             | 30 | 166 |
|    | rR3P164 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKP             | 30 | 167 |
|    | rR3P165 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKO             | 30 | 168 |
|    | rR3P166 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKS             | 30 | 169 |
|    | rR3P167 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKT             | 30 | 170 |
| 25 | rR3P168 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKV             | 30 | 171 |
|    | rR3P169 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKW             | 30 | 172 |
|    | rR3P170 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKY             | 30 | 173 |
|    | rR3P171 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNKZ             | 30 | 174 |
|    | rR3P172 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRY             | 30 | 175 |
| 30 | rR3P173 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRI             | 30 | 176 |
|    | rR3P174 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRJ             | 30 | 177 |
|    | rR3P175 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRK             | 30 | 178 |
|    | rR3P176 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRL             | 30 | 179 |
|    | rR3P177 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRM             | 30 | 180 |
|    | rR3P178 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRN             | 30 | 181 |
| 35 | rR3P179 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRO             | 30 | 182 |
|    | rR3P180 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRQ             | 30 | 183 |
|    | rR3P181 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRK             | 30 | 184 |
|    | rR3P182 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRJ             | 30 | 185 |
|    | rR3P183 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRK             | 30 | 186 |
| 40 | rR3P184 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRL             | 30 | 187 |
|    | rR3P185 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRM             | 30 | 188 |
|    | rR3P186 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRN             | 30 | 189 |
|    | rR3P187 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRO             | 30 | 190 |
| 45 | rR3P188 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRQ             | 30 | 191 |
|    | rR3P189 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRK             | 30 | 192 |
|    | rR3P190 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRJ             | 30 | 193 |
|    | rR3P191 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRK             | 30 | 194 |
|    | rR3P192 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRL             | 30 | 195 |
|    | rR3P193 | 1 | HSDAVFTDNYTRLRKQMAAKKYLNLSIKNRM             | 30 | 196 |
| 50 | PAC1    | 1 | ESDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 176 |
|    | PAC2    | 1 | HKDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 177 |
|    | PAC3    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 178 |
|    | PAC4    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 179 |
|    | PAC5    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 180 |
| 55 | PAC6    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 181 |
|    | PAC7    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 182 |
|    | PAC8    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 183 |
|    | PAC9    | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 184 |
|    | PAC10   | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 185 |
|    | PAC11   | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 186 |
|    | PAC12   | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 187 |
|    | PAC13   | 1 | HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAYL-NH <sub>2</sub> | 27 | 188 |

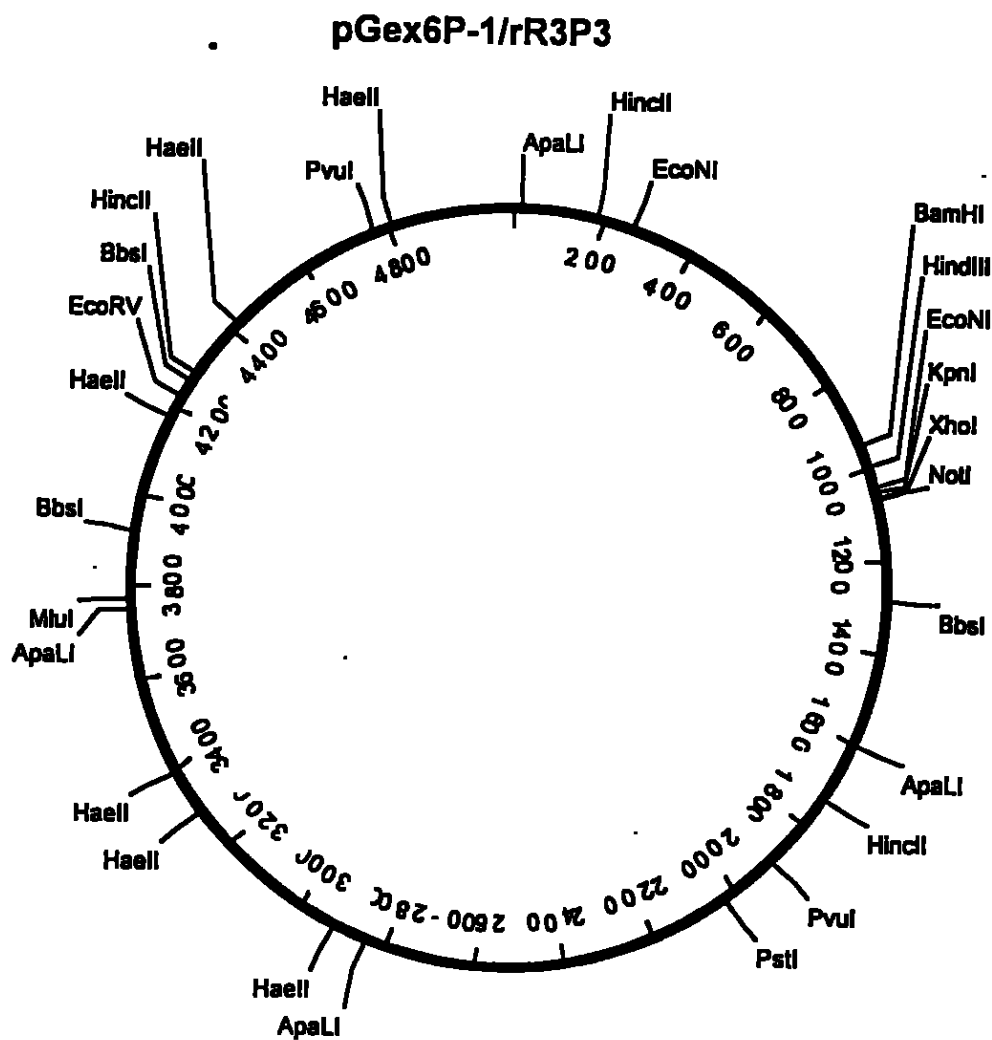


Figure 3

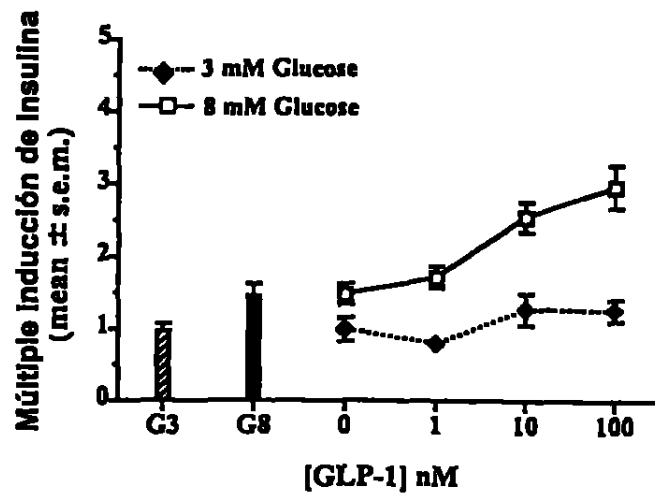


Figure 4A

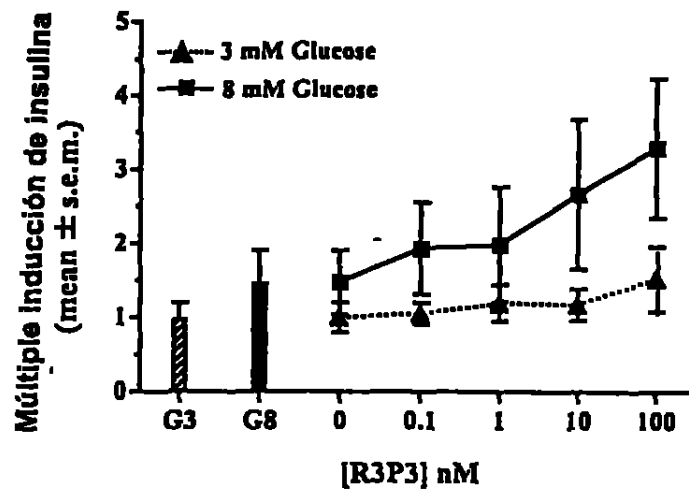
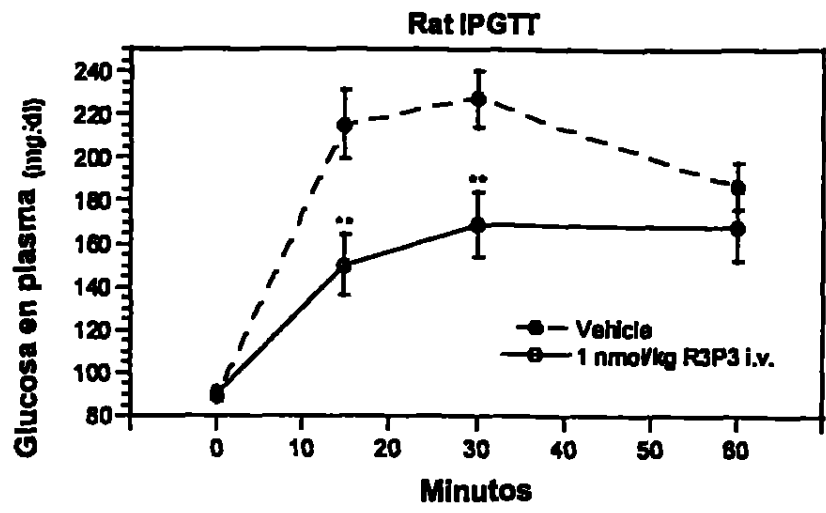
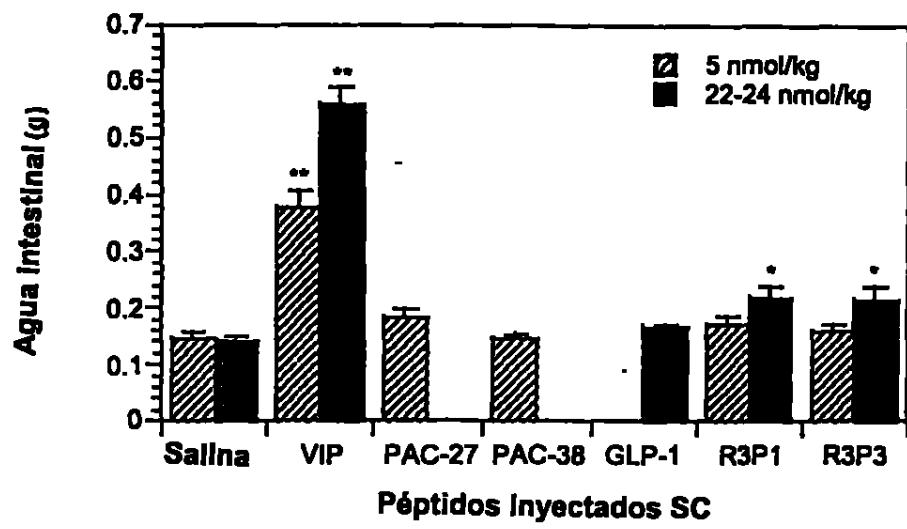


Figure 4B



5

Fig. 5



10

Fig. 6

5053CIP2

53

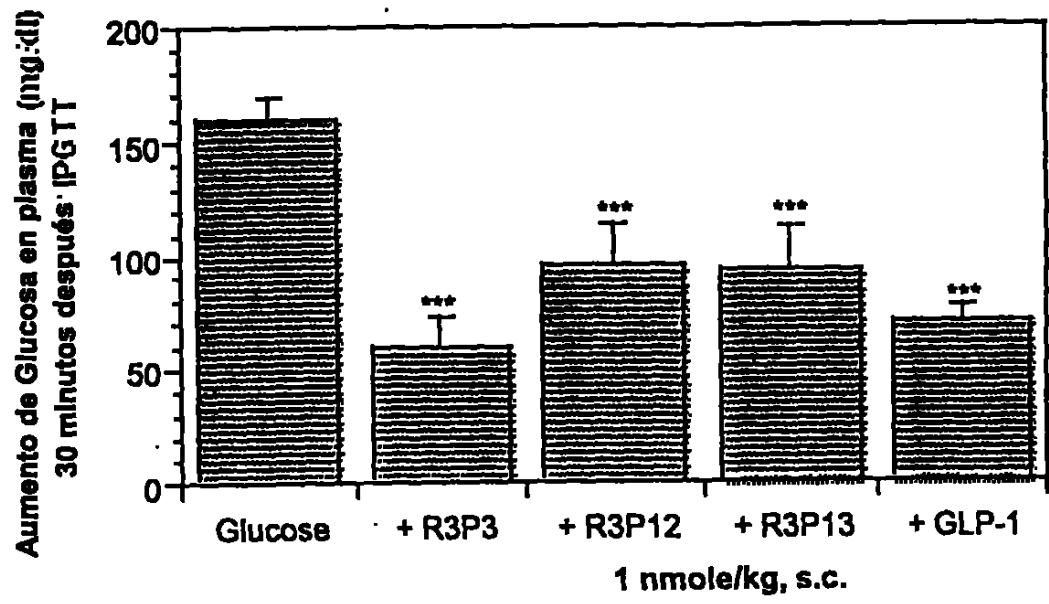


Fig. 7

5

5 rPACAP 27 (SEQ ID NO: 203)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGGTATCTTCACCGACTCCTACTCGAGGTACC  
 GCAAGCAGATGGCT TAAAGAAATATCTGGCTGCAGTTCTGTAATGACTCGAG

10 rPACAP 38 (SEQ ID NO: 54)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGGTATCTTCACCGACTCCTACTCTCGGTACCG  
 CAAGCAGATGGCTGTAAAGAAATATCTGGCTGCAGTCCTAGGCAAACGTTACAAGCAAC  
 GCCTTAAAAACAAGTAATGACTCGAG

15 rVP (SEQ ID NO: 55)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAACTAATGACTCGAG

20 rR3P3 (SEQ ID NO: 58)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGATGCTGTTTTACCGAAAACTACACCAAGCTTCG  
 TAAACAGCTGGCAGCTAAGAAATACCTCAACGACCTGAAAAAGGGCGGTACCTAATGAC  
 TCGAG

25 rR3P9 (SEQ ID NO: 204)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAGGCGGTACCTAATGA  
 CTCGAG

30 rR3P12 (SEQ ID NO: 205)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGCTGGCTGCTAAGAAATACCTGAACGACATCAAGAAAGGTGGCACCTAATGA  
 CTCGAG

35 rR3P33 (SEQ ID NO: 206)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGCTGGCTGCTAAGAAATACCTGAACGACATCAAGAAATAATGAC

40 rR3P41 (SEQ ID NO: 207)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAATAATGACTCGAG

45 rR3P42 (SEQ ID NO: 208)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAACTAATGACTCGAG

50 rR3P43 (SEQ ID NO: 209)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAAATAATGACTCGAG

55 rR3P44 (SEQ ID NO: 210)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGGAAGTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAACTAATGACTCGAG

55 rR3P45 (SEQ ID NO: 211)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAACTAATGACTCGAG

55 rR3P48 (SEQ ID NO: 212)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGCTGGCTGTAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAACTAATGACTCGAG

5  
rR3P47 (SEQ ID NO: 213)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAACTAATGACTCGAG

10  
rR3P48 (SEQ ID NO: 214)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGTTAAGAAATACCTGAATGACATCCTGAACTAATGACTCGAG

15  
rR3P49 (SEQ ID NO: 215)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAACTAATGACTCGAG

20  
rR3P50 (SEQ ID NO: 216)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCCTGAAATAATGACTCGAG

25  
rR3P51 (SEQ ID NO: 217)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAATAATGACTCGAG

30  
rR3P52 (SEQ ID NO: 218)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGCGTTACTAATGA  
CTCGAG

35  
rR3P53 (SEQ ID NO: 219)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGCGTTAATGACTC  
GAG

40  
rR3P54 (SEQ ID NO: 220)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGTAATGACTCGAG

45  
rR3P55 (SEQ ID NO: 221)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAACAAAGCGTTACTAATGA  
CTCGAG

50  
rR3P56 (SEQ ID NO: 222)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGTTAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGCGTTACTAATGAC  
TCGAG

55  
rR3P57 (SEQ ID NO: 223)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGTTAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGCGTTAATGACTC  
GAG

55  
rR3P58 (SEQ ID NO: 224)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGTTAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAAAAGTAATGACTCGAG

55  
rR3P59 (SEQ ID NO: 225)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCCTACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGTTAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAACAAAGCGTTACTAATGAC  
TCGAG

rR3P50 (SEQ ID NO: 225)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGGTTGCTGCAAAAGAAATACCTGCAGTCCATCAAGAAATAATGACTCGAG

5 rR3P61 (SEQ ID NO: 227)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATCGCTGCAAAAGAAATACCTGCAGACTATCAAGAAATAATGACTCGAG

10 rR3P82 (SEQ ID NO: 228)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGGTTGCTGCAAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAATAATGACTCGAG

15 rR3P63 (SEQ ID NO: 229)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTGC  
GTAACAGATGGCTGCAAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

20 rR3P71 (SEQ ID NO: 230)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACCACTACACGCGCTTAA  
GAAAACAGATGGCTGCAAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTACTAATGA  
CTCGAG

25 rR3P98 (SEQ ID NO: 231)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTGACAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

30 rR3P99 (SEQ ID NO: 232)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTGAGAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

35 rR3P100 (SEQ ID NO: 233)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTTTCAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAATT  
C

40 rR3P101 (SEQ ID NO: 234)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTGGCAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

45 rR3P102 (SEQ ID NO: 235)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTCACAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

50 rR3P103 (SEQ ID NO: 236)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTATCAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAATT  
C

55 rR3P104 (SEQ ID NO: 237)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACCTCCGACGCTGTTTTACCCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTAAAAAGAAATACCTGAATTCATCAAGAAACAAGCGTTAATGAGAATT  
C

87  
87

5 rR3P105 (SEQ ID NO: 238)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTCTGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

10 rR3P106 (SEQ ID NO: 239)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTATGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

15 rR3P107 (SEQ ID NO: 240)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTAACAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

20 rR3P108 (SEQ ID NO: 241)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTCCGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

25 rR3P109 (SEQ ID NO: 242)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTCAGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

30 rR3P110 (SEQ ID NO: 243)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTCGCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

35 rR3P111 (SEQ ID NO: 244)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTTCCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

40 rR3P112 (SEQ ID NO: 245)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTACCAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

45 rR3P113 (SEQ ID NO: 246)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTGTGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

50 rR3P114 (SEQ ID NO: 247)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTTGGAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
TC

55 rR3P115 (SEQ ID NO: 248)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGCTTAAG  
AAAACAGATGGCTTACAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCGTTAATGAGAAT  
C

5 R3P118 (SEQ ID NO: 249)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGACAACAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

10 R3P118 (SEQ ID NO: 250)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGACAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

15 R3P119 (SEQ ID NO: 251)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGAGAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

20 R3P120 (SEQ ID NO: 252)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTTCAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

25 R3P121 (SEQ ID NO: 253)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGACAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

30 R3P122 (SEQ ID NO: 254)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCGGACAACAAGCGTTAATGAGAA  
 ATTC

35 R3P123 (SEQ ID NO: 255)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCATCAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

40 R3P124 (SEQ ID NO: 256)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCATGAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

45 R3P125 (SEQ ID NO: 257)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAACAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

50 R3P126 (SEQ ID NO: 258)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCCCGAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

55 R3P127 (SEQ ID NO: 259)  
 GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTCACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
 GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCCAGAACAAGCGTTAATGAGAA  
 TTC

5  
rR3P128 (SEQ ID NO: 260)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGGAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

10  
rR3P129 (SEQ ID NO: 261)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGCAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

15  
rR3P130 (SEQ ID NO: 262)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAGGAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

20  
rR3P131 (SEQ ID NO: 263)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTGGAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

25  
rR3P132 (SEQ ID NO: 264)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTGGAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

30  
rR3P133 (SEQ ID NO: 265)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCTACAACAAGCGTTAATGAGAA  
TTC

35  
rR3P134 (SEQ ID NO: 266)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGCGCGTTAATGAGAA  
TTC

40  
rR3P135 (SEQ ID NO: 267)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGACCGTTAATGAGAA  
TTC

45  
rR3P136 (SEQ ID NO: 268)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGAACGTTAATGAGAA  
TTC

50  
rR3P137 (SEQ ID NO: 269)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGTTCCGTTAATGAGAA  
TTC

55  
rR3P138 (SEQ ID NO: 270)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGGCCGTTAATGAGAA  
TTC

5 rR3P140 (SEQ ID NO: 271)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCACCGTTAATGAGAA  
TTC

10 rR3P141 (SEQ ID NO: 272)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACATCCGTTAATGAGAA  
TTC

15 rR3P142 (SEQ ID NO: 273)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAA  
TTC

20 rR3P143 (SEQ ID NO: 274)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACATGCGTTAATGAGAA  
TTC

25 rR3P144 (SEQ ID NO: 275)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACACCGTTAATGAGAA  
TTC

30 rR3P145 (SEQ ID NO: 276)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAA  
TTC

35 rR3P146 (SEQ ID NO: 277)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCAGCGTTAATGAGAA  
TTC

40 rR3P147 (SEQ ID NO: 278)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTGCGTTAATGAGAA  
TTC

45 rR3P148 (SEQ ID NO: 279)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAGCCGTTAATGAGAA  
TTC

50 rR3P149 (SEQ ID NO: 280)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACACCCGTTAATGAGAA  
TTC

55 rR3P150 (SEQ ID NO: 281)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACGTGCGTTAATGAGA  
ATTC

5  
R3P151 (SEQ ID NO: 282)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAAGCTGGCGTTAATGAGAA  
TTC

10  
R3P152 (SEQ ID NO: 283)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAAGCTACCGTTAATGAGAA  
TTC

15  
R3P153 (SEQ ID NO: 284)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGCGTAATGAGAA  
TTC

20  
R3P155 (SEQ ID NO: 285)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCT C  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGACTAATGAGAA  
TTC

25  
R3P154 (SEQ ID NO: 286)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGAGTAATGAGA  
ATTC

30  
R3P157 (SEQ ID NO: 287)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTTCTAATGAGAA  
TTC

35  
R3P158 (SEQ ID NO: 288)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGGCTAATGAGA  
ATTC

40  
R3P159 (SEQ ID NO: 289)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCACTAATGAGAA  
TTC

45  
R3P150 (SEQ ID NO: 290)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGATCTAATGAGAA  
TTC

50  
R3P151 (SEQ ID NO: 291)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGAAGTAATGAGAA  
TTC

55  
R3P162 (SEQ ID NO: 292)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCTGTAATGAGAA  
TTC

5 rR3P163 (SEQ ID NO: 293)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGATGTAATGAGAA  
TTC

10 rR3P164 (SEQ ID NO: 294)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGAACTAATGAGAA  
TTC

15 rR3P165 (SEQ ID NO: 295)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCCGTAAATGAGAA  
TTC

20 rR3P166 (SEQ ID NO: 296)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGCAGTAATGAGAA  
TTC

25 rR3P167 (SEQ ID NO: 297)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGAGCTAATGAGAA  
TTC

30 rR3P168 (SEQ ID NO: 298)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGACCTAATGAGAA  
TTC

35 rR3P169 (SEQ ID NO: 299)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGGTGTAATGAGAA  
TTC

40 rR3P170 (SEQ ID NO: 300)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTGGTAATGAGAA  
TTC

45 rR3P171 (SEQ ID NO: 301)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACAAGTACTAATGAGAA  
TTC

50 rR3P174 (SEQ ID NO: 302)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAA  
TTC

55 rR3P175 (SEQ ID NO: 303)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAA  
TTC

5 rR3P176 (SEQ ID NO: 304)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTgcaAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAATT  
C

10 rR3P177 (SEQ ID NO: 305)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTcgcaAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAATT  
C

15 rR3P178 (SEQ ID NO: 308)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTtccaAAGAAATACCTGAACTCCATCAAGAACCCTATCTAATGAGAATT  
C

20 rR3P179 (SEQ ID NO: 307)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

25 rR3P180 (SEQ ID NO: 308)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTggcaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

30 rR3P181 (SEQ ID NO: 309)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTgccaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

35 rR3P182 (SEQ ID NO: 310)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTcgcaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

40 rR3P183 (SEQ ID NO: 311)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTtccaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

45 rR3P184 (SEQ ID NO: 312)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

50 rR3P185 (SEQ ID NO: 313)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTggcaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

55 rR3P186 (SEQ ID NO: 314)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTgccaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

rR3P187 (SEQ ID NO: 315)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTcgcaAAGAAATACCTGAACTCCATCccgAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

5 rR3P188 (SEQ ID NO: 316)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTTCAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

10 rR3P189 (SEQ ID NO: 317)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGCAAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

15 rR3P190 (SEQ ID NO: 318)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTGGCAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

20 rR3P191 (SEQ ID NO: 319)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTTCAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

25 rR3P192 (SEQ ID NO: 320)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTCGCAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

30 rR3P193 (SEQ ID NO: 321)  
GGATCCATCGAAGGTCGTCACTCCGACGCTGTTTTACCGACAACCTACACGCGTCTGC  
GTAAACAGATGGCTTCAAGAAATACCTGAACTCCATCCGTAACCGTATCTAATGAGAATT  
C

Figure 8

% Average frequency  
Cardiac  
% heart rate increase  
over vehicle / respect  
à vehic

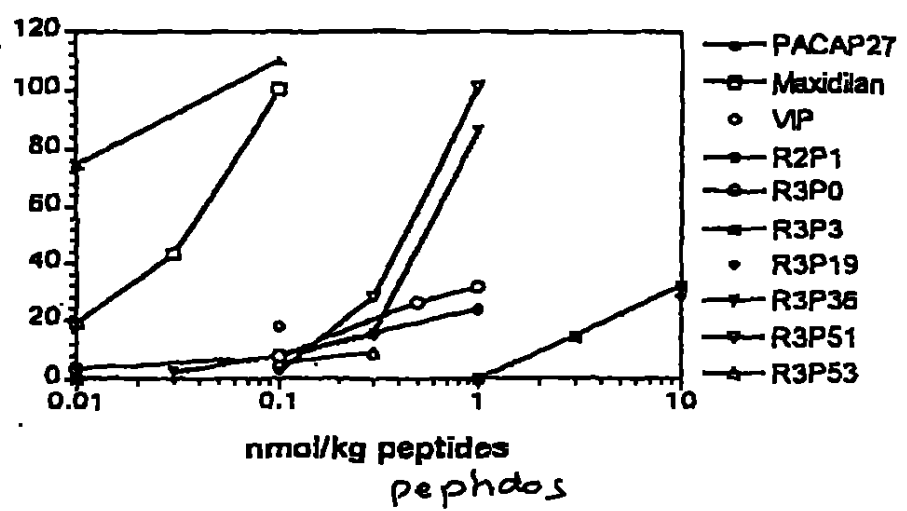


Figure 2

10

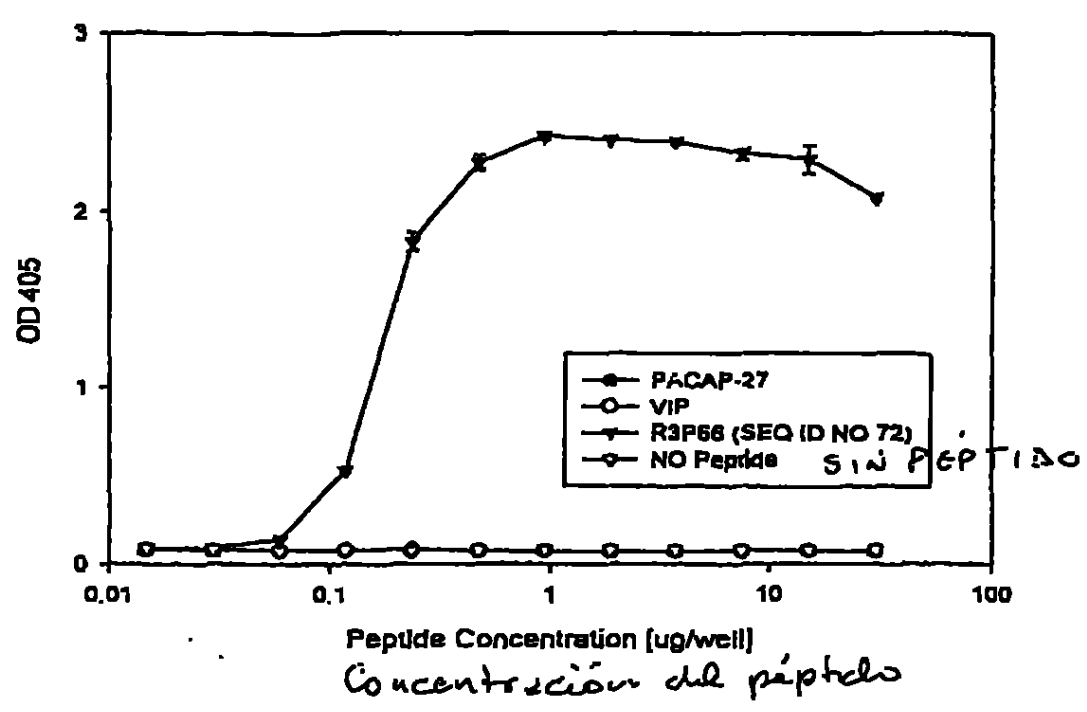


Fig. 10



**CONSULADO DE COLOMBIA**  
**WASHINGTON, D.C.**

No. 1040

**EL CONSULADO DE COLOMBIA**  
**CERTIFICA**

Que es auténtica la firma de PATRICK O. HATCHETT.  
quien el día 19 DE ABRIL DEL 2000  
desempeñaba las funciones de OFICIAL DE AUTENTICACIONES DEPARTAMENTO DE ESTADO  
la cual aparece al pie de los documentos anexos relacionados con REPRESENTACION Y PODER.

Dado en Washington, D.C. a los VEINTICINCO (25) días del mes de  
ABRIL. del año dos mil (2000)

Pagado Impuesto de Timbre 7=

Pagado Derecho Consular 15=

Total 22=

*Jaqueline Espitia Arias*  
**JAQUELINE ESPITIA ARIAS**  
Vicecónsul

(El Consulado no asume ninguna  
responsabilidad por el contenido de los  
documentos anexos)

25 ABR 2000

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

27163521

JARQUE ESPITA  
QUINA FERRAL ARABIA DE ESTEREO  
JOCURENO DE SEPEÑA  
EAS FINGENTES INDICADAS

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

1988 JUN -7 A 143

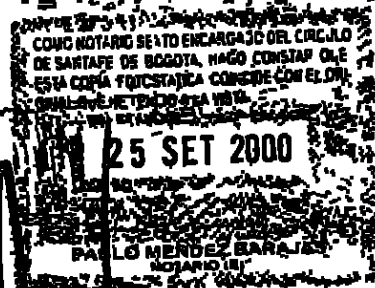
ULFE DE LETIZIA  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO ENCARGADO DEL CREGA  
DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE  
ESTA ACTA FOTOGRAFICA CONCRETO EL DIA  
25 SET 2000  
PABLO RENDIZ TAJAS

I, Deborah Collins Asst. Clerk of the Town of West Haven

in said County, do hereby certify that Elaine Porter  
by and before whom the foregoing (or annexed) acknowledgment was taken, was at the time of taking the same  
a notary public (or other officer) residing (or authorized to act) in said County, and was authorized by the laws  
of said State to take and certify acknowledgments in said State, and, further, that I believe that the signature to  
the certificate of acknowledgment is genuine.

IN TESTIMONY WHEREOF, I have hereunto set my hand and affixed the seal of the State and Town this

13th day of April 1900Deborah Collins  
Asst. Town Clerk

00034295-4  
United States of America



DEPARTMENT OF STATE

To all to whom these presents shall come, Greetings:



I Certify That the document hereunto annexed is under the Seal of the State(s) of Connecticut, and that such Seal(s) is/are entitled to full faith and credit.\*

NOTARIO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA CONFIERE CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA

In testimony whereof, I, Strobe Talbott Acting Secretary of State, have hereunto caused the seal of the Department of State to be affixed and my name subscribed by the Assistant Authentication Officer, of the said Department, at the city of Washington, in the District of Columbia, this nineteenth day of April, 2000.

Strobe Talbott  
Acting Secretary of State  
By Patricia A. Harbo  
Assistant Authentication Officer,  
Department of State

Issued pursuant to CHIV Stat. of  
Sept. 15, 1789 1 Stat. 68-69-22  
USC 2657-22 USC 2651; 5 USC  
301 28 USC 1733 et. seq., 8 USC  
1443(f); RULE 44 Federal Rules of  
Civil Procedure.

\*For the contents of the annexed document, the Department assumes no responsibility  
This certificate is not valid if it is removed or altered in any way whatsoever

**STATE OF CONNECTICUT  
OFFICE OF THE SECRETARY OF THE STATE**

I, **SUSAN BYSIEWICZ**, Secretary of the State of Connecticut and keeper of the seal thereof,

DO HEREBY CERTIFY, that DEBORAH COLLINS, was duly elected or appointed to the office of ASSISTANT CITY AND TOWN CLERK, for the town of WEST HAVEN in the County of NEW HAVEN in said state, for the term of DECEMBER 5, 1999 to DECEMBER 2, 2001,

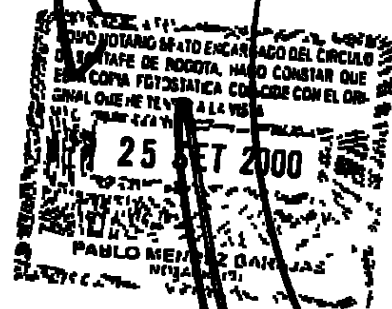
and that to his/her acts and attestations as such, full faith and credit are and ought to be given in and out of Court

In Testimony Whereof, I have hereunto set my hand and affixed the Great Seal of the State of Connecticut, at Hartford, on April 14, 2000



*Susan Bysiewicz*

Secretary of the State



Subscribed and sworn to before me this 10<sup>th</sup> day of April, 2000

Elaine Porter  
ELAINE PORTER  
NOTARY PUBLIC  
MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001

NOTARY PUBLIC  
CIRCULO DE SANTIAGO DE LOS CABALLEROS  
DE SANTIAGO DE LOS CABALLEROS  
DE SANTIAGO DE LOS CABALLEROS

25 SET 2000

LORENZO BARAJAS



# CAVELIER

ABOGADOS

EDIFICIO SSKU  
CARRERA 4 No. 72 35  
BOGOTA 8, COLOMBIA

For patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, slogans

Para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, lemas comerciales

## REPRESENTACION Y PODER

## REPRESENTATION AND POWER OF ATTORNEY

I (we), the undersigned/Yo (nosotros), abajo firmado (a)

BAYER CORPORATION

of/domiciliado (a) en 100 BAYER ROAD, PITTSBURGH, PENNSYLVANIA 15205,  
UNITED STATES OF AMERICA

por el presente nominamos a EMILIO FERRERO tpa. 31829; GONZALO PERDOMO, tpa. 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1º del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como más (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y al ser tratado de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, sumisándose por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistír, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiales.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31829; GONZALO PERDOMO, tpa. 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on cases, and the more fact or its absence will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs, the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, vegetal varieties and denominations of origin, its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; the action for writ mandamus, the protection of trade secrets and industrial secrets, penal, and administrative suits relating to trade rights, actions and suits initiated by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Given and signed this/Dado y firmado hoy 11th day of April, 2000.

In/En West Haven, Connecticut, United States of America

Signature

Name: Jerome M. Silverman  
Title: Vice President, Patents and Licensing

Firma

© CAVELIER ABOGADOS  
(Minuta N° 12.112.8.USA)

Subscribed and sworn to before me this 11th day of April, 2000

ELAINE FOSTER  
NOTARY PUBLIC

MY COMMISSION EXPIRES JUNE 30, 2001

**CERTIFICADO NOTARIAL (INDIVIDUO)**

A los \_\_\_\_\_ días del mes de \_\_\_\_\_ de 19\_\_

ante mí, Notario Público de \_\_\_\_\_

compareció(eron) personalmente \_\_\_\_\_

a quien(es) doy fe de conocer y me consta que es(son) la(s) persona(s) firmante(s) del documento que precede, y quien(es) tiene(n) capacidad legal para otorgarlo.

\_\_\_\_\_  
Notario Público Notary Public

\* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

**CERTIFICADO (PARA SOCIEDAD)**

De conformidad con las leyes de Estados Unidos de America, yo soy el funcionario que tiene la facultad legal de certificar acerca de la existencia y representación de la Sociedad/Compañía.

denominada BAYER CORPORATION

Certifico:

1. Que he visto los siguientes documentos:

Ver ABATO

2. Que dichos documentos prueban lo siguiente:

2.1. Que BAYER CORPORATION

es una Sociedad/Compañía legalmente constituida y existente

de acuerdo con las leyes de Estado de Indiana,

Estados Unidos de América

2.2. Que el domicilio de dicha Sociedad/Compañía es

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania

15205, Estados Unidos de América

2.3. Que el objeto u objeto para los cuales se otorga el presente poder están comprendidos dentro del objeto social de la mencionada Sociedad/Compañía.

2.4. Que el(los) Sr.(Sres.) JEFFREY M. Greenman

está(n) autorizado(s) para otorgar el presente Poder.

Ciudad West Haven

Estado Connecticut

Hoy 12 Abril de 2000

Signature: \_\_\_\_\_

Nombre del funcionario:

Cargo:

Firma: \_\_\_\_\_

\* Los documentos deben identificarse con fecha y origen.

1. Articles of Incorporation fechados 6 Marzo, 1996 en Indianapolis, Indiana - EE UU

2. Articles of Merger de Bayer USA, y Bayer Corporation

4. Miles Financial Services and Miles Inc. y

CAMBIO de nombre a Bayer Corporation, certificado

por el Secretario de Estado de Indiana en Indianapolis

© CAVELIER ABOGADOS el 10 Abril 1995.

3. Estatutos de Bayer Corporation de 10 Abril 1995

4. Resolución de la Junta Directiva de Miles Inc. a

Ahora Bayer Corporation de una reunión de la Junta

fechada 22 Nov. 1991 autorizando funcionarios para

firmar documentos legales en nombre de la

Sociedad

**NOTARIAL CERTIFICATE (INDIVIDUAL)**

On this \_\_\_\_\_ day of \_\_\_\_\_, 19\_\_

before me, a Notary Public of \_\_\_\_\_

personally appeared \_\_\_\_\_

to me known, and known to me to be the person(s) who executed that foregoing document, and who has(have) legal capacity to execute it.

\_\_\_\_\_  
Notary Public

\* Documents must be identified with date and origin.

**CERTIFICATE (FOR CORPORATION)**

According to the laws of the United States of America, I am the official who has the legal function to certify about the existence and representation of Corporation/Company

named BAYER CORPORATION

I Certify:

1. That I have seen the following documents:

- See below -

2. That the above documents duly prove the following:

2.1. That BAYER CORPORATION

is a Corporation/Company legally constituted and in existence

in accordance with the laws of the State of Indiana,

United States of America

2.2. That the domicile of said Corporation/Company is

100 Bayer Road, Pittsburgh, Pennsylvania 15205,

United States of America

2.3. That the purpose of purposes for which the present Power of Attorney is granted are comprised within the corporation purposes set forth in the Charter of the mentioned Corporation/Company.

2.4. That Mr.(Messrs.) Jeffrey M. Greenman

is(are) authorized to grant the present Power of Attorney.

City West Haven

State Connecticut

This 12th day of April, 2000.

Signature: \_\_\_\_\_

Name of Attesting Officer: George J. Lykos

Position held: Vice President, Assistant General

Counsel, and Assistant Secretary

Signature: \_\_\_\_\_

\* Documents must be identified with date and origin.

1. Articles of Incorporation of Miles Inc., filed and approved 6 March 1996,

Indianapolis, Indiana, U.S.A.

2. Articles of Merger of Bayer U.S.A. Inc., and Bayer Corporation,

and Miles Financial Services Inc., into Miles Inc., and change

of name of the survivor to Bayer Corporation; certified by the

Secretary of State of the State of Indiana, at Indianapolis, Indiana,

10 April 1995.

3. Bylaws of Bayer Corporation effective as of April 1, 1995.

4. Resolution of the Board of Directors of Miles Inc., now Bayer Corporation,

at a meeting of the Board held 22 November 1991, authorizing corporate

officers to execute legal instruments on behalf of the corporation.

Sociedad

TRADUCCIÓN OFICIAL N° 0806001 del inglés al español de los sellos y autenticaciones que aparecen en el documento de poder otorgado por BAYER CORPORATION, preparada por Jaime Armando Garavito Burgos, Traductor Oficial debidamente reconocido por el Ministerio de Relaciones Exteriores y aprobado por el Ministerio de Justicia de la República de Colombia mediante Resolución N° 034 de enero 11 de 1983

-----  
Documento escrito en inglés y español por medio del cual BAYER CORPORATION, otorga poder a favor de EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER. Dado y firmado el 11 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América (firmado) Jeffrey M. Greeman

Nombre: Jeffrey M. Greenman

Cargo: Vicepresidente, Patentes y Licenciamiento

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 11 de abril del 2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

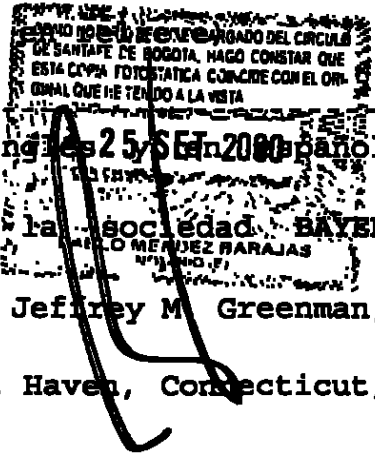
(Sello notarial en tinta y sello notarial

-----  
CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) en inglés y español referente a la existencia legal de la sociedad BAYER CORPORATION y su representante autorizado Jeffrey M. Greenman, expedida el 12 de abril del 2000 en West Haven, Connecticut, Estados Unidos de América

Suscrito y juramentado en mi presencia hoy 10 de abril del 2000. (firmado) ELAINE PORTER, Notario Público

(Sello notarial en tinta y sello notarial en relieve)

-----



(Aparece escudo impreso)

ESTADO DE CONNECTICUT

]

declaración juramentada

West Haven

CONDADO DE New Haven

Yo, Deborah Collins, Subsecretario de la ciudad de West Haven en dicho condado, por medio del presente certifico que Elaine Porter por quien ante quien se hizo el reconocimiento anterior (anexo), era en el momento de hacerlo un notario público (u otro funcionario) residente (o autorizado para actuar) en dicho Condado y estaba autorizado por las leyes de dicho Estado para hacer y certificar reconocimientos en dicho Estado. Certifico además que creo que la firma en dicho certificado de reconocimiento es auténtica.

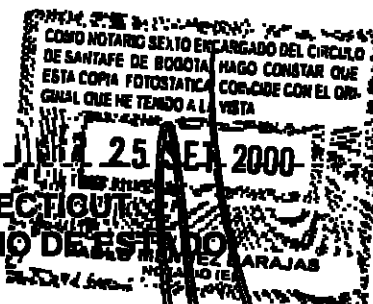
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, he estampado mi firma y el sello del estado y ciudad hoy 13 de abril del 2000.

(firmado) Deborah Collins, Subsecretaria del Poblado

(Aparece sello en relieve)

ADIN33 FORMATO 223

ESTADO DE CONNECTICUT  
OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO



Yo, SUSAN BYSIEWICZ, Secretario del Estado de Connecticut y guardián de su sello,

POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO que DEBORAH COLLINS, fue debidamente electa o nombrada al cargo de SUBSECRETARIA DE CIUDAD Y DE PUEBLO, para la población de WEST HAVEN en el Condado de NEW HAVEN en dicho estado, por el período comprendido entre DICIEMBRE 5, 1999 y DICIEMBRE 2, 2001;

(Aparece adherido sello dorado)

y que se da y deberá darse plena fe y crédito a sus actos y testimonios como tales, tanto procesal como extraprocesalmente. En testimonio de lo cual, he estampado mi firma y el Gran Sello del Estado de Connecticut en Hartford el 14 de abril del 2000 (firmado) Susan Bysiewicz, Secretaria del Estado

N° 00034295-4

Estados Unidos de America

(Aparece escudo)

DEPARTAMENTO DE ESTADO

A todos aquellos a quienes los presentes llegaren, Saludos.

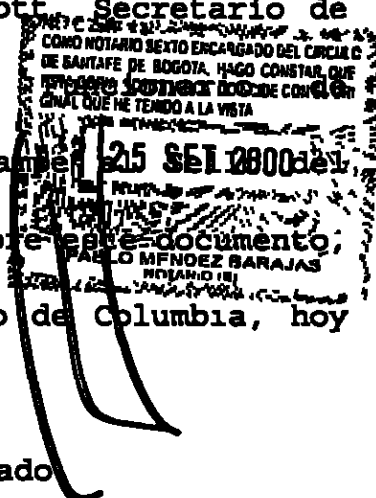
Certifico que el documento adjunto al presente se encuentra bajo el(los) Sello(s) del Secretario de Estado del Estado de Connecticut y que debe darse plena fe y crédito a dicho(s) Sello(s).\*

En testimonio de lo cual, yo, Strobe Talbott, Secretario de Estado Encargado, he hecho que el Autenticaciones de dicho Departamento estan en el Departamento de Estado y suscriba en mi nombre este documento, en la ciudad de Washington, en el Distrito de Columbia, hoy diecinueve de abril del 2000

(firmado) Strobe Talbott, Secretario de Estado

(Firmado) Patrick O. Hatchett, Funcionario Asistente de Autenticaciones Departamento de Estado

\*El Departamento no asume ninguna responsabilidad por el contenido del documento anexo.



Este certificado no es válido si se le remueve o altera en cualquier forma

(Sello en relieve del Departamento de Estado de los Estados Unidos de América)

(El formulario detalla las disposiciones legales bajo las cuales fue emitido e impreso)

-----  
N° 1040. EL CONSULADO DE COLOMBIA en Washington, D C , Estados Unidos de América, certifica las funciones y firma de PATRICK O. HATCHETT, el 25 de abril del 2000. Pagado impuesto de timbre y derechos consulares. (firmado) JAQUELINE ESPITIA ARIAS, Vicecónsul

-----  
EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES en Santa Fe de Bogotá, D.C. certifica la firma y las funciones de JAQUELINE ESPITIA, el 07 de junio del 2000 N° 276352. (firmado) Jefe de Legalizaciones

-----  
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en los archivos de esta oficina para su confrontación a la cual me remito

Santa Fe de Bogotá, D C , junio 08 del 2000

COMO NOTARIO SERTO ENCARGADO DEL CIRCULO DE SANTA FE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE ESTA COPIA FOTOSTATICA CONCORDA CON EL ORIGINAL QUE SE ENCUENTRA EN MI OFICINA  
25 SET 2000  
PABLO MENDEZ BARRERA  
JAIME A. GARAVITO B  
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL  
Res 034 de Enero 11 de 1983  
MINISTERIO DE JUSTICIA

| Expediente No  |                            | No de Folio |
|----------------|----------------------------|-------------|
| 00073865       |                            |             |
| No de unidades |                            | ✓           |
| 1              | CD                         |             |
| 2              | DVD                        |             |
| 3              | REVISTA                    |             |
| 4              | LIBRO                      |             |
| 5              | PERIODICO                  |             |
| 6              | DISQUETES                  |             |
| 7              | SOBRE DE MANILA X          |             |
| 8              | SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA  |             |
| 9              | SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO |             |
| 10             | OTROS:                     |             |

Observaciones:

● Un sobre gr.  
 contiene arte final ●

MINISTERIO DE RELACIONES  
EXTERIORES

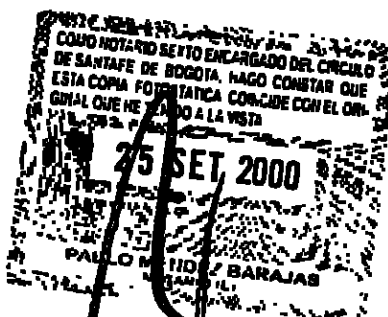
278511-  
JAIME GARAVITO  
CUIA FIRMA APARECE EN LA  
FOTOCOPIA DESEMPEÑA  
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME  
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2000 JUN -8 12:58

OFICINA DE RELACIONES  
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE  
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) ANTERIOR(ES) FIR-  
MA(S) PUESTA(S) POR  
Jaime Garavito  
IDENTIFICADOS CON C.S. No.(s)  
SERON AUTENTICA(S)  
SANTAFE DE BOGOTA 09 JUN 2000





**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 58,740  
FECHA : SEPTIEMBRE 18 DE 2000

**SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO**  
Radicación : 62773825 630000228 Folios: 111  
Fecha (UTC): 2000-09-28 17:32:43  
Trámite : C22 PATENTES D : REGISTRO/ 41: PRESENTAC  
Dependencia: ESSE DIVISION DE REGISTRO DE MARCAS

\*\*\*\*\* CONSIGNACION \*\*\*\*\*

| DEPOSITANTE       | TIPO PAGO    | BANCO         | SUCURSAL | CUENTA      | No. PAGO | Vr. PAGO      |
|-------------------|--------------|---------------|----------|-------------|----------|---------------|
| CAVELIER ABOGADOS | CONSIGNACION | BANCO POPULAR | BOGOTA   | 050-00110-6 | 2772042  | 20,319,300.00 |

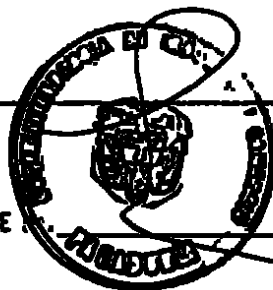
\*\*\*\*\* CONCEPTO \*\*\*\*\*

| CANT. HISTORICO           | CONCEPTO                          | TOTAL CONCEPTO |
|---------------------------|-----------------------------------|----------------|
| 1 50005-01-01 SOLICITUDES | TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN | 608,000.00     |
|                           | TOTAL                             | \$ 608,000.00  |

SON: SEISCIENTOS OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : \_\_\_\_\_

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE \_\_\_\_\_



raera 13 No. 27-00 Pisos 5 y 10  
Conmutador 334 12 21  
Fax 281 31 25  
e-mail: info@sic.gov.co  
Fe de Bogotá, D.C., Colombia

Bayer Corporation  
COB: 09577 801017.1

10 fos folias 107 a 109 son extracto y folios 107 a 109 2020/12/15



**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE**

**PATENTE DE INVENCION [X]**

**MODELO DE UTILIDAD [ ]**

- |              |                                                                                               |                |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| PAG 1        | • Nombre e identificación del Solicitante                                                     | [ ]            |
| PAG 1        | • Nombre e identificación del Inventor                                                        | [ ]            |
| PAG 1        | • Título o nombre de la Invención                                                             | [ ]            |
| PAG 2        | • Descripción 2                                                                               | [ ]            |
| PAG 3        | • Reivindicaciones 73                                                                         | [ ]            |
| PAG 76       | • Resumen 76                                                                                  | [ ]            |
|              | • Comprobante de Pago 111                                                                     | [ ]            |
|              | • Poder, cuando proceda                                                                       | [ ]            |
|              | • Copia de la primera solicitud de patente, si reivindica prioridad, señalándola expresamente | [ ]            |
|              | • Firma del solicitante o apoderado                                                           | [ ]            |
| COMPLETA [ ] |                                                                                               | INCOMPLETA [ ] |

**DISEÑO INDUSTRIAL [ ]**

- |                                                                      |                |
|----------------------------------------------------------------------|----------------|
| • Nombre e identificación del peticionario                           | [ ]            |
| • Nombre e identificación del inventor o diseñador                   | [ ]            |
| • Indicación del género de productos para los cuales debe utilizarse | [ ]            |
| • Representación gráfica                                             | [ ]            |
| • Comprobante de pago                                                | [ ]            |
| • Poder, cuando proceda                                              | [ ]            |
| • Firma del solicitante o apoderado                                  | [ ]            |
| COMPLETA [ ]                                                         | INCOMPLETA [ ] |

Firma Responsable

Fecha: 2003-09-29 17:20:43  
Tramite : 002 FORTALES 3 : REGISTRAR / 41: PRESENTAR  
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

Carrera 13 No. 27-00 Piso 8 y 10  
Commutador: 334 12 21-2-3-4  
Fax: 281 31 26 e-mail: info@sic.gov.co  
Santa Fe de Bogotá D.C. - Colombia



43  
110

**Industria y Comercio**  
**SUPERINTENDENCIA**

2020  
Bogotá, D.C.

Doctor  
**EMILIO FERRERO**  
Apoderado

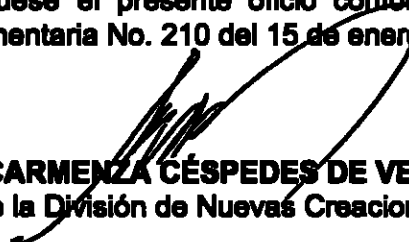
|                    |                       |                 |
|--------------------|-----------------------|-----------------|
| <b>REFERENCIA:</b> | <b>Radicación No.</b> | <b>00073865</b> |
|                    | <b>Trámite</b>        | <b>002</b>      |
|                    | <b>Evento</b>         | <b>001</b>      |
|                    | <b>Actuación</b>      | <b>430</b>      |
|                    | <b>Oficio No.</b>     | <b>0338</b>     |
|                    | <b>Folios</b>         | <b>001</b>      |

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le comunica que:

- Debe allegar copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente otorgado por el inventor al solicitante o a su causante (art. 28-k, Dec 486/2000).

En cumplimiento del artículo 39 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, se le requiere para que dentro del término de dos (2) meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el artículo 8 de la Resolución Reglamentaria No. 210 del 15 de enero del 2001.

  
**ALIX CARMENZA CÉSPEDES DE VERGEL**  
Jefe de la División de Nuevas Creaciones

15 FEB. 2001

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha \_\_\_\_\_.

Se recuerda al interesado que debe presentar, dentro de los dieciséis meses siguientes contados a partir de la fecha de presentación de la solicitud cuya prioridad se invoca, copia de la misma certificada por la autoridad que la expidió, un certificado de la fecha de presentación de esa solicitud expedida por la misma autoridad y, en los casos en que haya lugar, la traducción simple del capítulo reivindicatorio. El incumplimiento de éste plazo, acarreará la pérdida de la prioridad invocada.

202022

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10  
Conmutador: 382 0840  
Fax: 382 2695  
E-mail: [Info@slc.gov.co](mailto:Info@slc.gov.co)  
Bogotá, D.C., Colombia