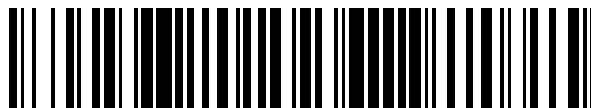


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 587**

21 Número de solicitud: 201430796

51 Int. Cl.:

C12N 15/10

(2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

28.05.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

30.11.2015

71 Solicitantes:

**FUNDACIÓ HOSPITAL UNIVERSITARI VALL
D'HEBRON-INSTITUT DE RECERCA (49.0%)
Edifici Mediterrània 2ªPlanta. Passeig Vall
d'Hebron, 119-129
08035 Barcelona ES;
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN SANITARIA
FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ (26.0%) y
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (25.0%)**

72 Inventor/es:

**EGIDO DE LOS RÍOS, Jesús;
GÓMEZ GUERRERO, Carmen;
SIMÓ CANONGE, Rafael y
HERNÁNDEZ PASCUAL, Cristina**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

54 Título: **PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1 PARA SU USO EN COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA
DIABETES**

57 Resumen:

Péptido derivado de SOCS1 para su uso en complicaciones crónicas de la diabetes, especialmente complicaciones oculares, renales, nerviosas y vasculares, así como composiciones que lo contienen y polinucleótidos aislados que lo codifican.

ES 2 552 587 A2

DESCRIPCIÓN

PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1 PARA SU USO EN COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES**OBJETO DE LA INVENCION**

La presente invención está relacionada con un péptido derivado de SOCS1 útil para la prevención y tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes, especialmente complicaciones oculares, renales, nerviosas y vasculares.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica de gran prevalencia, que causa frecuentemente lesiones en diversos órganos, especialmente retina, riñón, nervios y el sistema vascular. Sus complicaciones suelen dividirse en: a) complicaciones agudas, como hipoglucemia, cetoacidosis y coma hiperosmolar; b) complicaciones crónicas o tardías, divididas a su vez en microangiopáticas (nefropatía, retinopatía, y neuropatía), macroangiopáticas (enfermedad cardiovascular) y pie diabético (macro y microangiopatía).

El enorme impacto socio-sanitario de la diabetes es debido a estas complicaciones crónicas, principalmente oculares (retinopatía), renales (nefropatía) y vasculares (aterosclerosis). Los abordajes actuales para tratar la diabetes, como el control estricto de la glucosa y la hipertensión, consiguen frenar la evolución de la enfermedad pero no evitan en muchos casos la aparición de complicaciones crónicas, en especial la retinopatía, los eventos cardiovasculares o la progresión de los pacientes a insuficiencia renal e incluso entrada en programas de diálisis y transplante.

El pie diabético es una de las afectaciones más frecuentes de la diabetes que produce una importante morbilidad y un alto riesgo de amputación y cuyo tratamiento requiere abordaje multidisciplinario. La retinopatía diabética es también una complicación frecuente de la diabetes y una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. En la etiopatogenia de la retinopatía diabética interviene la hiperglucemia *per se* y las vías metabólicas directamente relacionadas con ella, provocando daño en el lecho capilar situado en la retina interna (lesión microangiopática). Clásicamente, la retinopatía diabética se ha considerado como una enfermedad microangiopática de la retina. Sin embargo, la evidencia actual indica que la neurodegeneración es un fenómeno precoz en la patogenia de la retinopatía diabética que participa en el desarrollo de las alteraciones microvasculares. En la actualidad no existen tratamientos específicos para las fases iniciales de la retinopatía diabética. Además, los tratamientos específicos indicados en fases avanzadas de la enfermedad (fotocoagulación con láser, inyecciones intravítreas de agentes como los anticuerpos anti-VEGF -"Vascular endothelial growth factor"- o corticoides o la vitrectomía) tienen una

efectividad limitada y una elevada tasa de efectos secundarios. Para prevenir la retinopatía diabética o tratarla en fases iniciales serían necesarios abordajes terapéuticos no invasivos. En este sentido la administración tópica ocular (colirio) sería la vía más adecuada debido a su carácter no invasivo ya que evitaría los efectos secundarios sistémicos.

- 5 En los últimos años se está dedicando gran esfuerzo para conocer los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, así como estudiar su potencial terapéutico.

La vía de señalización JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) es un importante mecanismo intracelular por el que la hiperglucemia y otros factores
10 contribuyen al desarrollo de la diabetes y sus complicaciones. JAK/STAT controla numerosos procesos celulares, como proliferación, migración y diferenciación, así como la expresión de mediadores inflamatorios. Se ha descrito un aumento en la expresión y activación de miembros de la vía JAK/STAT en placas de ateroma, en biopsias renales de pacientes diabéticos y en modelos animales de retinopatía y nefropatía diabética.

- 15 La familia de proteínas SOCS (Suppressors Of Cytokine Signaling) es el principal mecanismo endógeno de regulación negativa de la vía JAK/STAT y alteraciones en los niveles de expresión se han relacionado con diferentes enfermedades inmunes e inflamatorias. Estudios experimentales en animales con modificaciones genéticas para miembros de la familia SOCS han demostrado un efecto protector en las células β pancreáticas, con reducción de la incidencia de diabetes (*Flodström-Tullberg et al., Diabetes 2003;52:2696-700*) y del daño renal asociado (*Ortiz-Muñoz et al., J Am Soc Nephrol 2010;21:763-72*), así como un efecto anti-aterosclerótico (*Ortiz-Muñoz et al., Arterioscler Thromb Vasc Biol 2009;29:525-531; Wesoly et al., Acta Biochim Pol 2010; 57(3):251-260; Liang et al., Int J Mol Med. 2013 May;31(5):1066-74*). Esto sugiere un potencial terapéutico de estas proteínas endógenas en las complicaciones de la diabetes.

- 25 El uso de péptidos miméticos de proteínas SOCS se ha descrito previamente en la encefalomiелitis alérgica experimental, un modelo de esclerosis múltiple (*Mujtaba et al., J Immunol 2005;175:5077-5086; Jager et al., J Neuroimmunol 2011;232:108-118*) y también en modelos de daño en nervios periféricos (*Girolami et al., Exp Neurol 2010;223:173-182*) e infección viral por poxvirus (*Ahmed et al., J Virol 2009;83:1402-1415*). Asimismo se han descrito polipéptidos SOCS como inhibidores de la señalización inducida por citoquinas, en particular en inflamación e infecciones virales o bacterianas (*US2009/0209458*). La publicación *WO2010/151495* describe péptidos antagonistas de SOCS-1 o SOCS-3, útiles como antivirales. En *US8,420,096* se describe un péptido soluble conteniendo la secuencia de SOCS1/SOCS3 y una secuencia de translocación de membrana y su potencial uso para tratamiento de enfermedades inmunes. En *US2009253618* se han descrito

asimismo péptidos de este tipo, para su uso en la diferenciación de neuronas. En US2009030179 se emplean como agentes antimicrobianos varios péptidos sintéticos de la región SOCS-box de estos péptidos.

5 A pesar de la investigación existente en este campo, y haberse postulado la relación entre la vía de señalización JAK/STAT, las proteínas SOCS y la diabetes, hasta la fecha no se ha descrito la administración efectiva de ningún péptido *per se* para la prevención o el tratamiento de complicaciones oculares, renales o vasculares de la diabetes. No se ha relacionado en ningún caso los peptidomiméticos SOCS con trastornos oculares.

DESCRIPCIÓN RESUMIDA DE LA INVENCION

10 Se ha encontrado que un polipéptido correspondiente a una región de la proteína SOCS1 tiene eficacia para el tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes *in vivo* en modelos animales de diabetes.

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido aislado que contiene

- a) la secuencia de SEQ ID NO 2 (DTHFRTFRSHADYRRI); o
 - 15 b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia;
- para la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido del primer aspecto, y al menos un vehículo o
 20 un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica

- a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; o
 - b) una variante a la secuencia de a) o b) que sea homóloga en al menos el 85% a la secuencia
 - 25 SEQ ID NO 2;
- para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un polipéptido aislado que contiene

- a) la secuencia de SEQ ID NO 2 (DTHFRTFRSHADYRRI); o
- b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2,
- 30 basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia;

para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

La invención también se refiere a un polinucleótido aislado que codifica

a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; o

5 b) una variante a la secuencia de a) que sea homóloga en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2;

para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

Asimismo se refiere al uso de un polinucleótido aislado que codifica

a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; o

10 b) una variante a la secuencia de a) que sea homóloga en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2;

para la preparación de un medicamento para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes,

Un último aspecto de la invención se refiere a un método de tratamiento, el cual comprende la
15 administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido del primer aspecto a un paciente con complicaciones crónicas de la diabetes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Evolución del modelo de retinopatía diabética. Niveles de glucosa en sangre (A) y peso corporal (B) a lo largo del modelo. El tratamiento con péptido inhibidor no afectó estos
20 parámetros.

Figura 2: Efecto protector del péptido inhibidor en la neurodegeneración de la retina de ratones diabéticos. (A) Imágenes representativas de la activación glial (inmunotinción de GFAP) en muestras de retina de ratones diabéticos (las flechas indican células positivas). (B) Cuantificación del área marcada con GFAP. El tratamiento con el péptido redujo la
25 neurodegeneración de la retina, mientras que el péptido control no causó ningún efecto.

Figura 3: Efecto anti-apoptótico del péptido en la retina de ratones diabéticos. (A) Imágenes representativas de la tinción túnel en muestras de retina de ratones diabéticos (las flechas indican células positivas). (B) Cuantificación del número de células apoptóticas. El tratamiento con péptido inhibidor redujo la apoptosis causada por la diabetes.

30 **Figura 4: Efecto renoprotector del péptido miS1 en la diabetes experimental.** (A) Imágenes representativas de cortes renales teñidos con PAS y resumen de la cuantificación de las lesiones

glomerulares y tubulointersticiales en los ratones diabéticos. (B) Determinación del contenido inflamatorio (macrófagos y linfocitos T) y la fibrosis en los riñones diabéticos. El tratamiento con péptido inhibidor redujo las lesiones renales, el infiltrado inflamatorio y la fibrosis inducidos por la diabetes.

5 **Figura 5: Efecto anti-aterosclerótico del péptido miS1 en la diabetes experimental.** (A) Evolución del tamaño de las placas de ateroma a lo largo del tiempo en cortes transversales de aorta de ratones diabéticos. (B) Análisis y cuantificación del contenido inflamatorio (tinción de macrófagos Moma2) y de marcadores de estabilidad de la placa (tinción de fibras de colágeno con sirius red y de células vasculares con α -actina) en las lesiones ateroscleróticas de ratones
10 diabéticos. *, $p < 0.05$ vs grupo control.

Figura 6: Efectos *in vitro* del péptido inhibidor y su control mutante inactivo. (A) Activación de STAT1 y STAT3 en macrófagos estimulados con citoquinas en presencia de diferentes concentraciones del péptido inhibidor o del péptido mutante. (B) Inmunofluorescencia de STAT3 en células vasculares (VSMC). Las flechas indican células positivas tras estimulación con
15 citoquinas. Las puntas de flecha muestran la inhibición de la actividad de STAT3 en presencia del péptido. (C) Producción de la proteína quimiotáctica CCL2 en macrófagos y VSMC. (D) Ensayo de migración de VSMC. *, $p < 0.05$ vs condiciones basales; #, $p < 0.05$ vs estimulación con citoquinas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

20 Tal y como indicado anteriormente, un primer aspecto de la invención es un polipéptido aislado que contiene

- a) la secuencia de SEQ ID NO 2 (DTHFRTFRSHADYRRI); o
- b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia;

25 para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

Uno o más de los aminoácidos de cualquiera de las secuencias mencionadas en la presente invención, en particular las SEQ ID NO 1, SEQ ID NO 2 y SEQ ID NO 3, pueden estar modificados, por ejemplo pueden encontrarse fosforilados. Según una realización particular, solo un aminoácido de la secuencia se encuentra modificado, preferiblemente fosforilado. Según una
30 realización preferida, es la tirosina (Y) el aminoácido fosforilado.

En el marco de la presente invención el término “% de identidad” o “idéntica en al menos un %”, en relación con secuencias de aminoácidos, significa el porcentaje de identidad determinado mediante el siguiente método: el alineamiento de dos secuencias aminoacídicas se realiza

mediante el servicio <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>, aplicando los ajustes por defecto de este servicio. Así, por ejemplo la SEQ ID NO1 sería una variante a la secuencia de SEQ ID NO según lo aquí definido.

El término “complicaciones crónicas de la diabetes”, en el marco de la presente invención, se entenderá que engloba, pero no necesariamente se limita a, complicaciones o trastornos oculares, renales, nerviosos y vasculares, entendiéndose aquí el término “vasculares” como englobando complicaciones tanto cardiovasculares como cerebrovasculares. De manera concreta, incluiría complicaciones seleccionadas entre retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinitis pigmentaria, nefropatía diabética, angiopatías diabéticas, incluyendo microangiopatías y macroangiopatías, tales como aterosclerosis diabética, pie diabético y enfermedad arterial periférica.

Así, de acuerdo con una realización particular, el péptido de la invención es para uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes, seleccionándose éstas del grupo formado por complicaciones o trastornos oculares, renales, nerviosos y cardiovasculares en pacientes diabéticos.

En una realización particular adicional, las complicaciones crónicas de la diabetes se seleccionan del grupo formado por retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinitis pigmentaria, nefropatía diabética, angiopatías diabéticas, microangiopatías diabéticas, macroangiopatías diabéticas, aterosclerosis diabética, pie diabético y enfermedad arterial periférica.

Según una realización preferida, la complicación crónica de la diabetes será un trastorno ocular, en particular retinopatía diabética.

De acuerdo con una realización particular, la variante a la secuencia SEQ ID NO 2 es idéntica en al menos un 90%, aún más preferiblemente en aproximadamente un 94%, cifra que se correspondería por ejemplo con el reemplazo de un aminoácido por otro en la secuencia SEQ ID NO 2, o la adición de un aminoácido a la secuencia SEQ ID NO 2. Según una realización particular, la variante sería la SEQ ID NO 1 (DTHFRTFRSHSDYRRI). Otras especies de mamíferos, tales como *Ratus Norvegicus*, *Gorilla gorilla gorilla*, *Oryctolagus cuniculus*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Cavia porcellus* o *Sus scrofa*, presentan la SEQ ID NO 1 o SEQ ID NO 2, ya que esta secuencia está muy conservada entre unas especies mamíferos y otras.

De acuerdo con una realización preferida, tal secuencia SEQ ID NO 2, o sus variantes idénticas en un porcentaje según lo definido anteriormente, está unida a una región de permeabilidad celular. Dicha región de permeabilidad celular puede seleccionarse de entre diferentes secuencias de permeabilidad descritas, generalmente pequeños péptidos de naturaleza catiónica o

hidrofóbica, como TAT (YGRKKRRQRRR), Antp (RQIKIWFQNRRMKW), PTD-5 (RRQRRTSKLMKR), 8K (K=Lys) y 6R (R=Arg). Más preferentemente, la región de permeabilidad celular es lisina-palmitato. Aún más preferiblemente, la región de permeabilidad celular está unida por el extremo amino terminal de la SEQ ID NO 2 o sus variantes idénticas.

5 En el alcance de la invención se incluye cualquier polipéptido que comprenda la mencionada secuencia o sus variantes idénticas según lo definido anteriormente. Sin embargo, según una realización preferida, el polipéptido consiste esencialmente en

- a) la secuencia de SEQ ID NO 2; o
 - b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2,
- 10 basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.

En particular, la variante consistirá en la secuencia SEQ ID NO 1.

El término “consiste esencialmente” en el marco de la presente invención se refiere a la inclusión de un máximo de 8 aminoácidos adicionales (o sea, un máximo de un 50% más) a las secuencias definidas o sus variantes homólogas, de acuerdo con realizaciones preferidas un máximo de 7, 6,

15 5, 4, 3, 2 o 1 aminoácidos adicionales, que pueden estar unidos independientemente al extremo amina de la secuencia, al extremo ácido o en cualquier lugar de la secuencia, pasando a formar parte de la secuencia.

En cualquiera de los casos anteriores, la secuencia puede o no estar unida a una región de permeabilidad celular como definida anteriormente.

20 Según una realización particular, el polipéptido consiste en la secuencia SEQ ID NO 2; puede o no estar unido a una región de permeabilidad celular como definida anteriormente.

En el caso de que el polipéptido sea para uso en complicaciones oculares en pacientes diabéticos, tales como retinopatía diabética, el polipéptido que contiene la secuencia de SEQ ID NO 2 o sus variantes idénticas según definido anteriormente, según una realización particular consiste

25 esencialmente en o es:

- a) la proteína SOCS1 de origen humano (UniProt: O15524);
 - b) la proteína SOCS1 de origen murino (UniProt: O35716); o
 - c) una variante a las secuencias de a) o b) que sea idéntica en al menos el 85% a la secuencia de aminoácidos de la proteína SOCS1 de origen murino o a la secuencia de aminoácidos de la
- 30 proteína SOCS1 de origen humano.

Al igual que cualquiera de las realizaciones particulares anteriores, al menos uno de los aminoácidos de la proteína SOCS1 de origen humano o murino, o una variante idéntica de las

mismas, puede encontrarse modificado, preferiblemente fosforilado. De acuerdo con una realización preferida, el aminoácido fosforilado o uno de los aminoácidos fosforilados será una tirosina (Y). Asimismo, la proteína SOCS1 según las definiciones previas, puede encontrarse unida a una región de permeabilidad celular, preferiblemente a un grupo lisina-palmitato. De acuerdo con una realización preferida, la región de permeabilidad celular se encuentra unida por el extremo N-terminal del polipéptido, siendo más preferiblemente la región de permeabilidad celular un grupo lisina-palmitato.

La variante idéntica en al menos el 85% incluye las proteínas SOCS1 de otros mamíferos, tales como *Ratus Norvegicus*, *Gorilla*, *Oryctolagus cuniculus*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*, *Cavia porcellus* o *Sus Scrofa*.

De acuerdo con realizaciones particulares, la variante a las secuencias de SOCS1 de origen humano o murino son idénticas en al menos un 90%, aún más preferiblemente en aproximadamente un 94%, a dichas secuencias.

Todas las realizaciones preferidas indicadas para este primer aspecto de la invención son aplicables también al resto de aspectos de la invención, detallados a continuación.

Un aspecto adicional de la invención es el uso de un polipéptido aislado que contiene

- a) la secuencia de SEQ ID NO 2 (DTHFRTFRSHADYRRI); o
- b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia;

para la preparación de un medicamento para la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

De acuerdo con otro aspecto de la invención, esta se refiere a una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de acuerdo con cualquiera de las definiciones anteriores, y al menos un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables, para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes, según la definición dada anteriormente.

En una realización preferida de la invención la composición es adecuada o está destinada a su uso en la prevención o tratamiento de trastornos oculares en pacientes diabéticos, preferentemente retinopatía diabética. También podría ser utilizada para otras enfermedades de la retina que cursen con neurodegeneración, como degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinitis pigmentaria.

Así según una realización particular, el vehículo o excipiente es un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable adecuado para la administración por vía oftálmica.

Las composiciones según la presente invención comprenden al menos un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptables. El término "vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias o entidades moleculares junto a los cuales es administrado el péptido de la invención. Tales vehículos o excipientes serán adecuados para la vía de administración elegida, y serán evidentes a un experto de la materia dependiendo de la vía de administración. Los vehículos pueden ser líquidos estériles, tales como agua o aceites, incluyendo aquellos derivados de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético, excipientes, disgregantes, agentes humectantes, o diluyentes. Vehículos y excipientes adecuados se describen por ejemplo en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E.W. Martin, el cual se incorpora por referencia a la presente solicitud.

Las composiciones según la presente invención pueden ser administradas por cualquier vía conocida, incluyendo vía oral, vía gastroentérica, vía parenteral, vía rectal, vía respiratoria y vía tópica, en particular por vía oftálmica. Asimismo las composiciones podrán contener otros principios activos o adyuvantes adecuados que serán evidentes al experto en la materia. Asimismo las composiciones podrían contener únicamente un solo polipéptido según la invención o dos o más polipéptidos según la invención.

En el caso de la vía oftálmica, el vehículo o excipiente debe ser adecuado para esta vía de administración. Las composiciones en este caso serán preparadas de manera conveniente, bien como una solución o una suspensión acuosa, en un vehículo o solución base oftálmico farmacéuticamente aceptable. Además del principio activo, en este caso el polipéptido según la invención, puede contener otros adyuvantes, tales como agentes antimicrobianos, conservantes, agentes quelantes, agentes reguladores de la tonicidad, agentes reguladores del pH, incluyendo soluciones tampón, agentes viscosantes, etc.

En las composiciones según la invención el péptido estará contenido en un rango de concentración de 1-12 mg/mL. En el caso particular de administración por vía ocular, el péptido estará contenido en una concentración de al menos 5 mg/mL, en realizaciones particulares estará contenido en una concentración de al menos 8 mg/mL, al menos 9 mg/mL, al menos 10 mg/mL, de acuerdo con una realización preferida en una concentración de $10\text{mg/mL} \pm 5\%$, es decir, $10\text{mg/mL} \pm 0.5\text{mg/mL}$. En el caso particular de administración por vía intraperitoneal, el péptido estará contenido en una concentración de entre 1 y 5 mg/mL, de acuerdo con una realización particular estará contenido en una concentración de entre 1 y 3 mg/mL, de acuerdo con realizaciones preferidas, en una concentración de $2\text{mg/mL} \pm 10\%$ o $\pm 5\%$, es decir, $\pm 0.2\text{mg/mL}$ o $\pm 0.1\text{mg/mL}$.

- La composición de acuerdo con la invención es adecuada para la administración de una dosis diaria de entre 10 y 200 µg del péptido por cada ojo. De acuerdo con una realización particular, el péptido se administrará en una dosis diaria de entre 30 y 70 µg por cada ojo, de acuerdo con una realización preferida en una dosis diaria de entre 40 y 60 µg por cada ojo, preferiblemente entre 45 y 55 µg por cada ojo. En el caso de administración por vía intraperitoneal o vía oral, la composición será adecuada para la administración de una dosis diaria de entre 1 y 16 mg del péptido por cada kg de peso del paciente o sujeto al que se realiza la administración, según realizaciones particulares entre 2 y 10 mg del péptido por cada kg de peso del paciente o sujeto, preferiblemente entre 2,5 y 3.5 del péptido por cada kg de peso del paciente o sujeto.
- Otro aspecto de la invención se refiere a un polinucleótido aislado que codifica
- a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; o
 - b) una variante a la secuencia de a) que sea homóloga en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2;
- para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes, según la definición anteriormente proporcionada.
- Según una realización particular, el polinucleótido aislado codifica
- a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 unida a un grupo lisina; o
 - b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2, unida a un grupo lisina;
- para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes, según la definición anteriormente proporcionada.
- Preferiblemente el polinucleótido anteriormente definido es adecuado o está destinado para su uso en la prevención o tratamiento de trastornos oculares en pacientes diabéticos, más preferiblemente la retinopatía diabética.
- A continuación se incluyen una serie de ejemplos ilustrativos, no limitativos de la presente invención.

EJEMPLOS

Materiales y métodos

Péptidos:

- Se sintetizó un péptido de 16 aminoácidos (SEQ ID NO 1: DTHFRTRSHSDYRRI, Asp Thr His Phe Arg Thr Phe Arg Ser His Ser Asp Tyr Arg Arg Ile), que se corresponde con la secuencia

“kinase inhibitory region” de la proteína SOCS1, unido a una región de permeabilidad celular (lisina-palmitato), en el cual la tirosina (Y) está fosforilada. A lo largo de los ejemplos se denominará miS1 el derivado péptido formado por SEQ ID NO 1 y el grupo lisina-palmitato. En algunos casos éste se conjugó con un marcador fluorescente para posibilitar su posterior seguimiento en tejidos y células. Asimismo se sintetizó también un péptido no funcional mutado (Mut) reemplazando F (Phe) por A (Ala): SEQ ID NO 3, DTHARTARSHSDYRRI, Asp Thr His Ala Arg Thr Ala Arg Ser His Ser Asp Tyr Arg Arg Ile; unido igualmente a la región de permeabilidad celular lisina-palmitato, para su uso como control de los experimentos. Los péptidos se disolvieron (<1% DMSO en solución salina) y se esterilizaron por filtración.

10 Animales:

Se emplearon dos modelos experimentales, concretamente un modelo experimental de diabetes tipo 2 (ratones db/db) y otro de diabetes tipo 1 (inyección de estreptozotocina en ratones apoE). Los ratones se mantuvieron en jaulas de tamaño estándar en condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad (60%), con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas y con acceso a comida (dieta estándar) y agua *ad libitum*. Estos estudios se han realizado según la legislación española vigente en cuanto al empleo, protección y cuidado de los animales de experimentación (Real Decreto 53/2013), siguiendo recomendaciones de la CEE (86/609/CEE) y ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) y han sido aprobados previamente por los Comités Éticos de las dos instituciones participantes (IIS-Fundación Jiménez Díaz/Universidad Autónoma de Madrid e Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron).

Tratamiento de la neurodegeneración de la retina causada por la diabetes mediante tratamiento tópico ocular con un péptido derivado de SOCS1

Ratones diabéticos (db/db) de 8 semanas recibieron el péptido miS1 en forma de colirio (gotas de 5 µL en cada ojo; 10 mg/mL; dos veces al día durante 15 días; n=4 ratones). Como controles se emplearon ratones diabéticos tratados con el péptido no funcional Mut (n=4), tratados con vehículo y no diabéticos (db/+). Se controló el peso y la glucemia (ensayo colorimétrico) a lo largo del periodo de estudio. En el día 15 se realizó eutanasia a los animales por dislocación cervical y los ojos enucleados se congelaron inmediatamente y se cortaron secciones dorsoventrales de 8mm para analizar la morfología de la retina y otros análisis inmunohistoquímicos. La activación glial se evaluó mediante inmunofluorescencia de GFAP (Glial fibrillar acidic protein). Las secciones fijadas se bloquearon (1% BSA y 10% suero de cabra en PBS, 2h a RT) y se incubaron con anticuerpos anti-GFAP (dilución 1:500, 16h a 4°C) seguido de un anticuerpo secundario (cabra anti-conejo, conjugado con Alexa 488, dilución 1:200). Las muestras se contrastaron con Hoesch y

se montaron para análisis en microscopio confocal. Las imágenes de muestras de diabéticos y controles se tomaron con idénticos parámetros y se analizó la distribución topográfica del marcaje GFAP en una escala de 0 a 5 (*Anderson et al. Clin Ophthalmol 2008;2(4):801-16*). La puntuación 1 indica ausencia de activación glial (inmunofluorescencia positiva para GFAP restringida a la capa de células ganglionares) mientras que la puntuación 5 representa la máxima activación glial (inmunofluorescencia para GFAP se extiende desde la capa de células ganglionares hasta el margen externo de la capa nuclear externa). La apoptosis se determinó mediante inmunohistoquímica TUNEL (Terminal Transferase dUTP Nick-EndLabeling; kit de fluorescencia) y posterior cuantificación en un microscopio de fluorescencia.

10 Tratamiento de la nefropatía y aterosclerosis causada por la diabetes mediante tratamiento intraperitoneal con un péptido derivado de SOCS1

Ratones macho deficientes en apolipoproteína E (apoE) de 8 semanas de edad se hicieron diabéticos por inyección de estreptozotocina (125mg/kg peso en 10mM citrato pH 4.5, dos días consecutivos). Después de 2 semanas, los animales con glucemia superior a 350 mg/dL se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos (n=9 animales por grupo): tratados (péptido miS1: 65 µg/día, 200µL, intraperitoneal, cada 2 días durante 8 semanas) y controles (vehículo). Se controló el peso y la glucemia (ensayo colorimétrico) a lo largo del periodo de estudio.

Al final del estudio, los animales anestesiados se perfundieron con salino y se sacrificaron, procesando los tejidos inmediatamente. En corteza renal (cortes en parafina, 5µm) se estudió la morfología glomerular y tubulointerstitial mediante tinciones de PAS y tricrómico de Masson y las lesiones se evaluaron de forma semicuantitativa y a doble ciego en escala 0-3. La fibrosis renal se determinó mediante tinción de rojo picrosirio y las células infiltrantes inflamatorias (macrófagos F4/80+ y linfocitos T CD3+) por inmunohistoquímica. En la aorta, la zona de raíz/arco (criocortes seriados de 8 µm desde las válvulas hasta una extensión de 1000 µm) se tiñó con Oil-red-O/hematoxilina y se cuantificó el área de la lesión aterosclerótica (programa Metamorph). La estabilidad de la placa se valoró por tinción de fibras de colágeno con rojo picrosirio e inmunofluorescencia de α-actina. El componente inflamatorio se determinó mediante inmunohistoquímica para monocito/macrófagos (Moma2). Utilizamos el programa Image Pro-Plus para cuantificar las tinciones positivas. Los parámetros bioquímicos en suero (hemoglobina glicada, colesterol y creatinina) y orina (albúmina y creatinina) se determinaron mediante kits comerciales convencionales.

Estudios in vitro

Se emplearon macrófagos RAW264.7 y células de músculo liso vascular (VSMC) cultivadas en medio con 10% suero bovino fetal. Las células se sincronizaron (24h sin suero), se preincubaron

durante 90 min con diferentes concentraciones de péptidos (miS1 o su control, 50-150 µg/mL) y se estimularon con citoquinas (IFN γ 103 U/mL; IL-6 102 U/mL). La activación de STAT se analizó mediante Western blot para las isoformas STAT1/STAT3 fosforiladas. La expresión de quimioquinas dependientes de la vía JAK/STAT (CCL2 y CCL5) se determinó mediante ELISA. La

5 viabilidad celular se analizó por ensayo colorimétrico MTT y la migración por ensayo de quimiotaxis.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar del total de animales por grupo y de al menos 3 cultivos celulares independientes. Para el análisis estadístico utilizamos el programa

10 GraphPadPrism (test ANOVA, Tukey y t de Student; significación con $P < 0.05$).

EJEMPLO 1: EFECTO DEL PÉPTIDO DE LA INVENCIÓN SOBRE LA NEURODEGENERACIÓN DE LA RETINA

En el modelo de diabetes tipo 2 (ratones db/db) se administró de forma local el péptido miS1 en forma de colirio (50 µg en 5 µL/ojo, dos veces al día) durante 15 días. La evolución del peso

15 corporal y los niveles de glucosa se muestran en la Figura 1.

La activación glial se midió con el marcador GFAP (Figura 2). Las retinas de ratones no diabéticos mostraron un grado 0-1, mientras que en los ratones diabéticos tratados con vehículo se observó una fuerte expresión de GFAP (grado 3-4) distribuida a lo largo de la membrana limitante interna y en las células de Müller, tanto en las terminaciones como en las fibras radiales

20 de la capa interna y externa de la retina. El tratamiento con péptido miS1 en gotas oculares redujo significativamente la expresión de GFAP (grado 1-2) en la retina de los ratones diabéticos. Por el contrario, el tratamiento con un péptido Mut (SEQ ID NO 3) no causó ningún efecto (grado similar al obtenido en diabéticos con vehículo).

La cuantificación de las células apoptóticas de retina en el modelo experimental se muestra en la

25 Figura 3. Se observó un mayor número de células apoptóticas en la retina de los ratones diabéticos en comparación con los no diabéticos de la misma edad. Además, el tratamiento con péptido miS1 en gotas redujo significativamente la apoptosis a niveles similares a los animales no diabéticos, mientras que el péptido Mut no tuvo ningún efecto anti-apoptótico. En todos los grupos, la apoptosis se observó principalmente en la capa de células ganglionares (GCL).

30 En conclusión, la administración en gotas oculares del péptido miS1 en ratones diabéticos previno la neurodegeneración de la retina, determinada por una reducción significativa (aproximadamente un 80%) de la tinción de proteína glial GFAP y de la apoptosis en comparación con los grupos que recibieron péptido Mut o vehículo.

EJEMPLO 2: EFECTO DEL PÉPTIDO DE LA INVENCION SOBRE LA NEFROPATÍA Y LA FORMACIÓN DE PLACAS DE ATEROMA EN RATONES DIABÉTICOS

En el modelo de diabetes tipo 1 (estreptozotocina en ratones apoE) se realizó el tratamiento sistémico con péptido miS1 (65 µg/día, cada 2 días) durante 8semanas. En la Tabla 1 se muestran los parámetros clínicos y metabólicos al final del estudio. Todos los ratones diabéticos presentaron niveles equivalentes de hiperglucemia (glucosa y hemoglobina glicada (HbA1c) y colesterol, lo que indica que el efecto protector del péptido no es debido a una posible acción sobre el control de la glucemia de estos animales. El tratamiento con miS1 también mejoró significativamente la función renal de los ratones diabéticos, observándose un 28% de descenso en los niveles de albuminuria. Además, la pérdida de peso originada por la diabetes crónica fue menos acusada en el grupo tratado con péptido miS1.

El análisis histológico en cortes renales de los ratones diabéticos demostró una mejora de las lesiones glomerulares (hipercelularidad y expansión mesangial) y túbulointersticiales (atrofia, degeneración e infiltrado) en el grupo tratado con péptido miS1 en comparación con los diabéticos que recibieron vehículo (Figura 4A). El péptido miS1 redujo significativamente el infiltrado inflamatorio de linfocitos y macrófagos y la fibrosis túbulointersticial (Figura 4B). En otra serie de experimentos estudiamos las propiedades anti-ateroscleróticas del tratamiento con péptido miS1 en los ratones diabéticos. La tinción de las placas de ateroma con Oil-red-O/hematoxilina y su posterior cuantificación mostraron una significativa reducción en el tamaño y extensión de las lesiones en los ratones diabéticos tratados con péptido miS1 (50% reducción en comparación con el grupo control que recibió vehículo; Figura 5A). El análisis de la composición de la placa demostró una disminución en el número de macrófagos en las lesiones de los animales tratados, así como un mayor contenido de colágeno y células vasculares (Figura 5B), indicando por tanto que el tratamiento redujo la inflamación y mejoró la estabilidad de las placas de ateroma de los animales diabéticos.

Tabla 1: Parámetros bioquímicos en el modelo experimental de diabetes tipo 1

Parámetro	Unidades	Control	Tratamiento miS1
Diferencia peso	Inicial-final	3.3 ± 0.3	2.0 ± 0.1*
Glucosa	mg/dL	528 ± 12	549 ± 29
HbA1c	µg/mL	470 ± 74	504 ± 75
Colesterol	md/dL	553 ± 17	611 ± 59
Albumina-Creatinina	µg/µmol	22.6 ± 1.4	16.2 ± 1.1*

*, P<0.05 vs grupo control

EJEMPLO 3: ESTUDIOS IN VITRO

En los estudios in vitro se emplearon macrófagos murinos y cultivos primarios de células de músculo liso vascular de ratón (Figura 6). En ambos casos la activación de la vía JAK/STAT se indujo por estimulación con las citoquinas proinflamatorias IFN γ e IL-6. La preincubación de macrófagos con concentraciones crecientes (50-150 ug/mL) del péptido inhibidor miS1 redujo de forma dosis-dependiente la activación de STAT1 y STA3 (determinada por los niveles de fosforilación de ambas proteínas en un ensayo de Western blot). Por el contrario, una dosis similar de péptido Mut (150 ug/mL) no causó ningún efecto, confirmándose así la especificidad del péptido inhibidor miS1. De forma similar, el péptido miS1 previno la activación de STAT1 y STAT3 en VSMC, como puede verse en las imágenes de inmunofluorescencia. Para determinar las consecuencias funcionales de la inhibición por el péptido miS1 se analizó la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos CCL2, cuya expresión depende de la vía JAK/STAT. La preincubación con el péptido inhibidor miS1, pero no con el péptido Mut, logró reducir significativamente (30-40%) la producción de CCL2 inducida por citoquinas, tanto en VSMC como en macrófagos. Por último, mediante ensayos de quimiotaxis se comprobó el efecto anti-migratorio del péptido inhibidor miS1 en macrófagos. No se observaron variaciones en la viabilidad celular de VSMC y macrófagos en ninguna de las condiciones experimentales estudiadas, lo que indica la no-toxicidad del péptido a las concentraciones empleadas.

EJEMPLO 4: JUSTIFICACIÓN DE QUE LOS DATOS APORTADOS SON EXTRAPOLABLES A HUMANOS

Los modelos animales y celulares usados en los ejemplos de la presente invención son aceptados en el sector médico y farmacéutico como modelos que permiten extrapolar los datos obtenidos mediante su uso a enfermedades humanas. Por un lado, el ratón deficiente en el gen de apolipoproteína E se caracteriza por tener un transporte reverso de colesterol deficiente que determina una hipercolesterolemia sistémica con alta acumulación de lípidos y colesterol en tejidos adiposos y periféricos. Este modelo de ratón desarrolla espontáneamente (de forma acelerada si se alimenta con dieta grasa) lesiones ateromatosas con algunas características similares a las lesiones humanas. Por ello, es uno de los modelos más ampliamente utilizado en investigación cardiovascular. En segundo lugar, la inducción de diabetes tipo 1 en los ratones apoE es un modelo experimental que combina hiperglucemia e hiperlipidemia (dos factores de riesgo en estas patologías) y que se caracteriza por un desarrollo rápido de aterosclerosis y nefropatía como consecuencia de la diabetes. Por último, el ratón db/db se caracteriza por una deficiencia en el receptor de leptina, desarrollo espontáneo de diabetes tipo 2 y obesidad a las 4-8 semanas de edad y un posterior proceso de neurodegeneración de la retina muy similar al que ocurre en las etapas iniciales de la retinopatía diabética en los pacientes diabéticos.

REIVINDICACIONES

- 1) Un polipéptido aislado que comprende
- a) la secuencia de SEQ ID NO 2; o
- 5 b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia;
- para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.
- 2) Un polipéptido para uso según la reivindicación 1, donde las complicaciones crónicas de la diabetes se seleccionan entre complicaciones oculares, renales, nerviosas y vasculares.
- 10 3) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde las complicaciones crónicas de la diabetes se seleccionan entre retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinitis pigmentaria, nefropatía diabética, angiopatías diabéticas, microangiopatías diabéticas, macroangiopatías diabéticas, aterosclerosis diabética, pie diabético y enfermedad arterial periférica.
- 15 4) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3, donde la complicación crónica de la diabetes es retinopatía diabética.
- 5) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la secuencia SEQ ID NO 2 o su variante idéntica en al menos el 85% está unida a una región de permeabilidad celular.
- 20 6) Un polipéptido para uso según la reivindicación 5, en el cual la región de permeabilidad celular es lisina-palmitato.
- 7) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 6, en el cual la región de permeabilidad celular está unida por el extremo N-terminal de la secuencia péptidica (residuo D, ácido aspártico).
- 25 8) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que consiste esencialmente en
- a) la secuencia de SEQ ID NO 2; o
- b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85 % a la SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los aminoácidos de dicha secuencia.
- 30 9) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, el cual consiste esencialmente en

- a) la proteína SOCS1 de origen murino (UniProt: O35716);
 - b) la proteína SOCS1 de origen humano (UniProt: O15524); o
 - c) una variante a la secuencia de a) o b) que sea homóloga en al menos el 85% a la secuencia de aminoácidos de la proteína SOCS1 de origen murino o a la secuencia de aminoácidos de la
- 5 proteína SOCS1 de origen humano.
- 10) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que consiste en la secuencia SEQ ID NO 2 unida a una región de permeabilidad celular.
- 11) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el cual se encuentra fosforilado al menos un aminoácido de su secuencia.
- 10 12) Un polipéptido para uso según la reivindicación 11, donde al menos uno de los aminoácidos fosforilados es un aminoácido tirosina (Y).
- 13) Un polipéptido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde un aminoácido tirosina (Y) está fosforilado.
- 14) Una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido tal y
- 15 como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y al menos un vehículo o un excipiente farmacéuticamente aceptables, para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.
- 15) Una composición según la reivindicación 14, para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones oculares, renales, nerviosas y vasculares de la diabetes.
- 20 16) Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 y 15, adecuada para su uso por vía oral, vía gastroentérica, vía parenteral, vía rectal, vía respiratoria o vía tópica, en particular por vía oftálmica.
- 17) Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, para su uso en la prevención o tratamiento de retinopatía diabética.
- 25 18) Una composición según la reivindicación 17, donde el vehículo es un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable.
- 19) Un polinucleótido aislado que codifica
- a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2; o

b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dicha secuencia;

para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

5 20) Un polinucleótido para uso según la reivindicación 19, donde las complicaciones crónicas de la diabetes se seleccionan entre complicaciones oculares, renales, nerviosas y vasculares de la diabetes.

10 21) Un polinucleótido para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 19 y 20, donde la complicación crónica de la diabetes se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética, degeneración macular asociada a la edad, glaucoma y retinitis pigmentaria, nefropatía diabética, angiopatías diabéticas, microangiopatías diabéticas, macroangiopatías diabéticas, aterosclerosis diabética, pie diabético y enfermedad arterial periférica.

22) Un polinucleótido aislado que codifica

a) la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO 2 unida a un grupo lisina; o

15 b) una variante a la secuencia de a) que sea idéntica en al menos el 85% a la secuencia SEQ ID NO 2, unida a un grupo lisina, basándose en la identidad de la totalidad de los nucleótidos de dicha secuencia;

para su uso en la prevención o tratamiento de complicaciones crónicas de la diabetes.

Figura 1

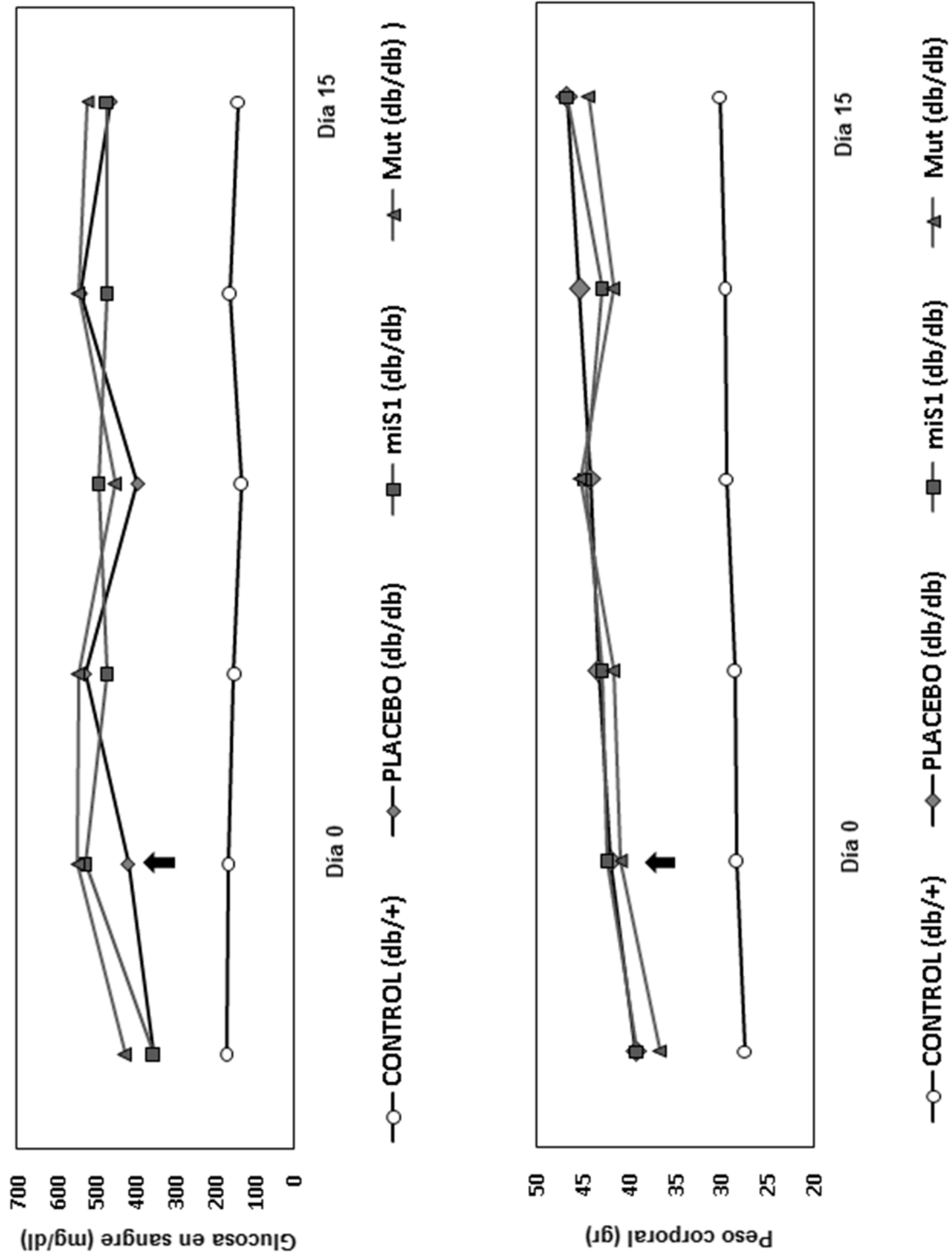


Figura 2

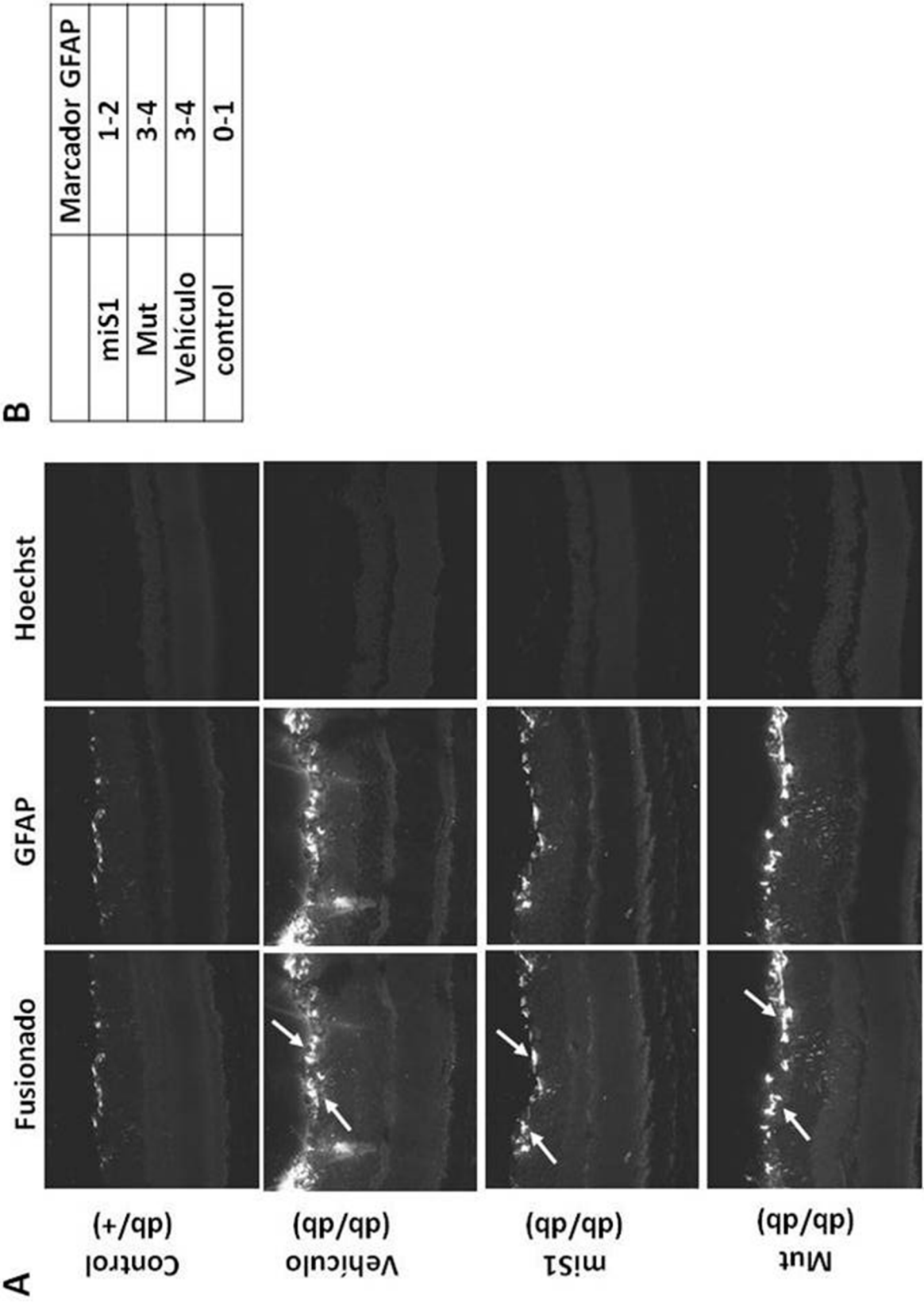


Figura 3

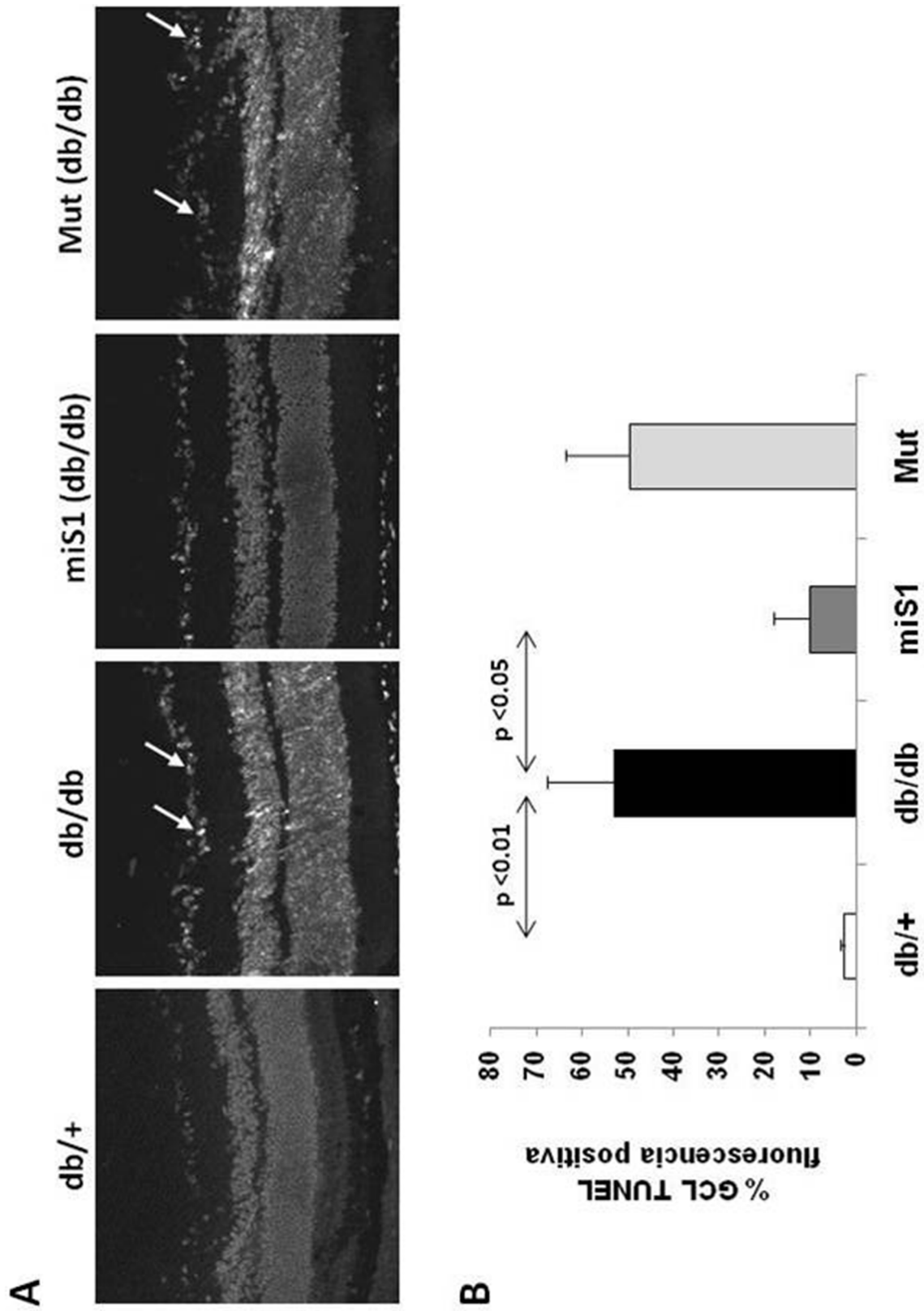
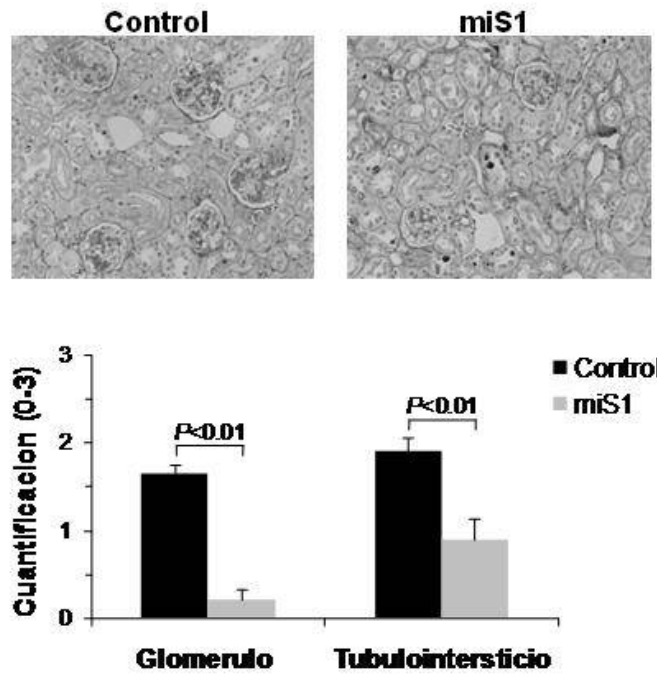


Figura 4

A



B

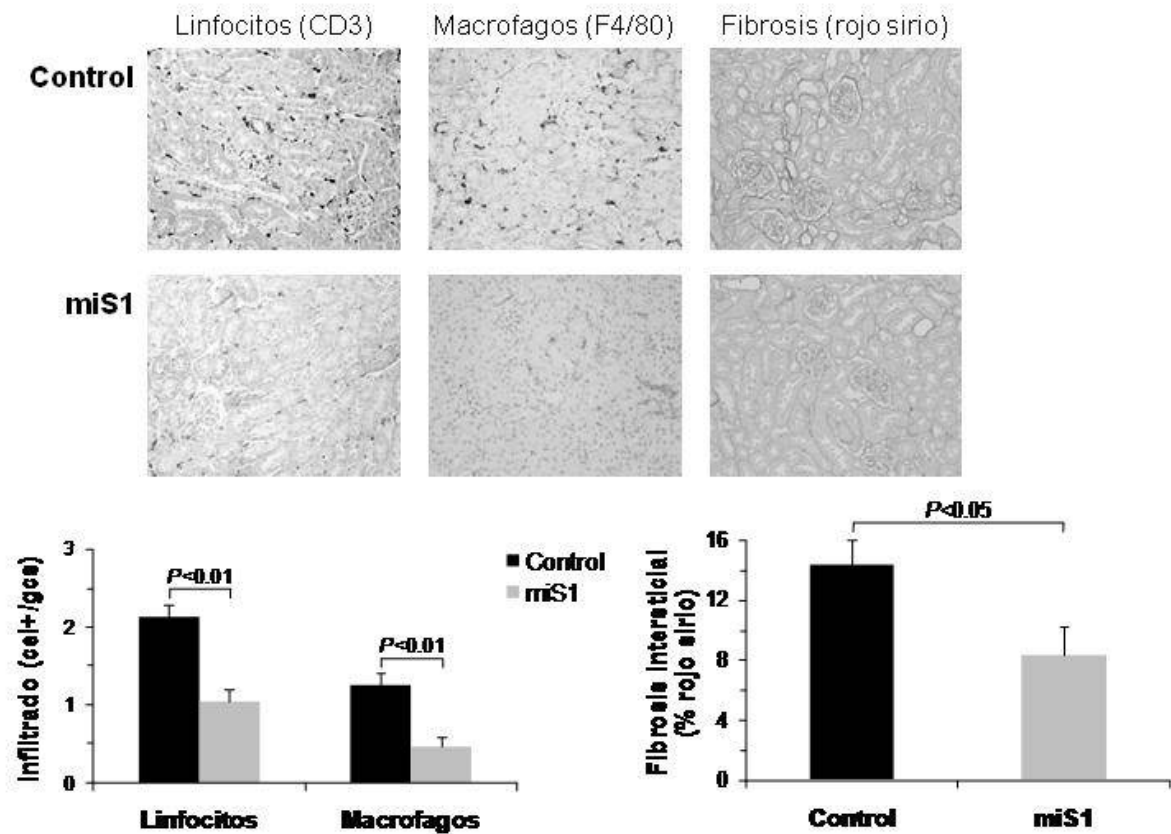


Figura 5

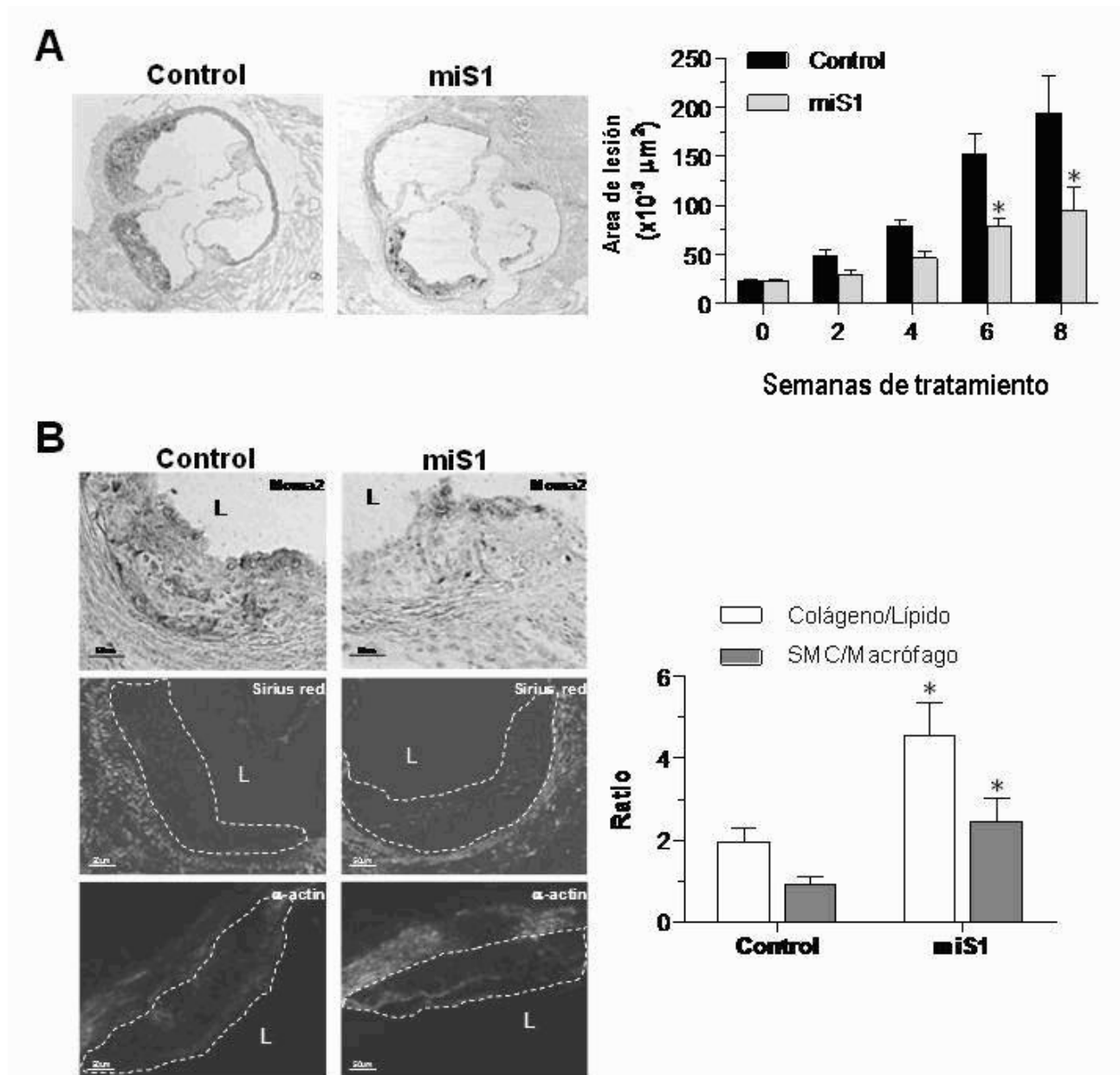
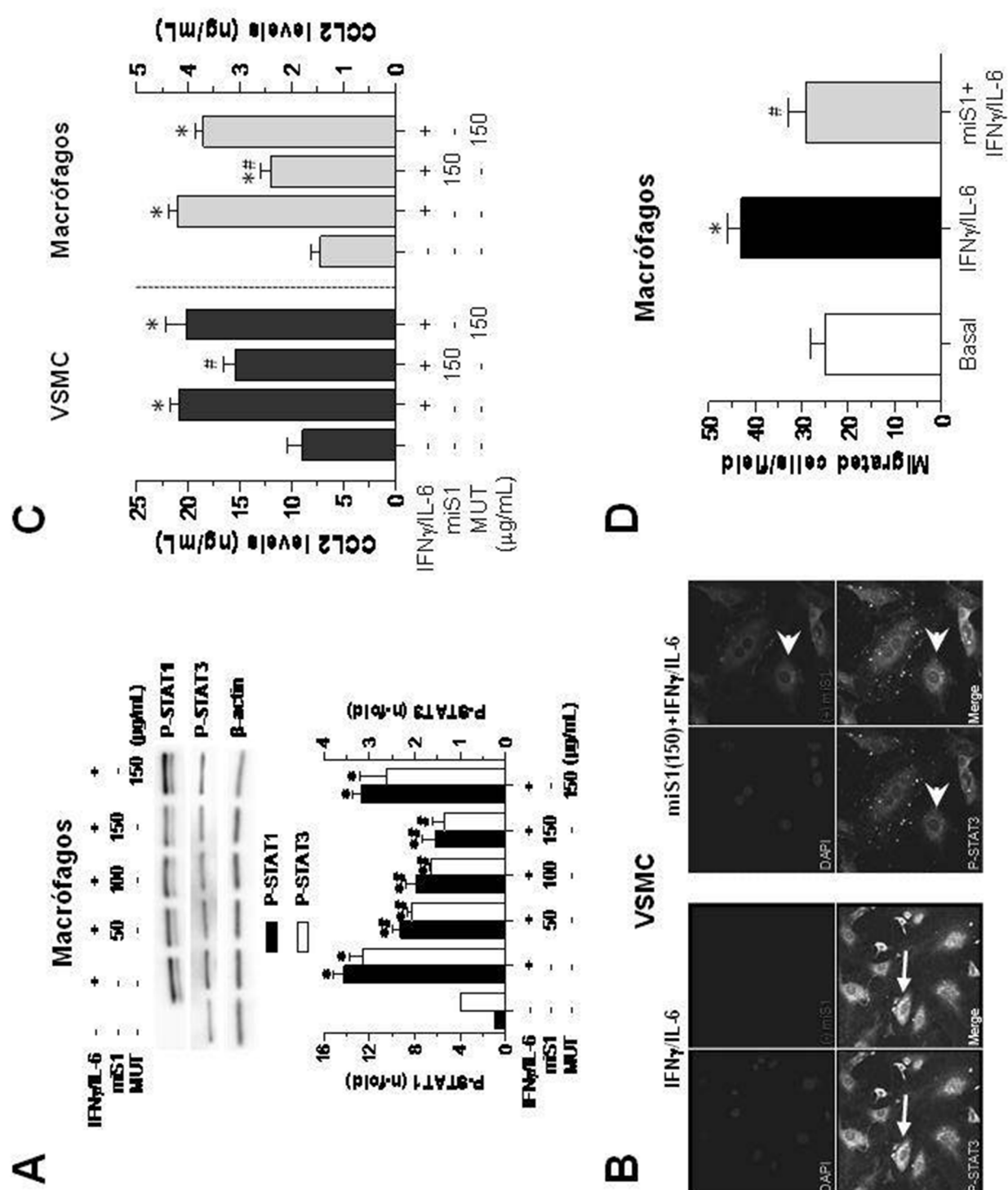


Figura 6



LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Vall d'Hebron Institut de Recerca
 Instituto de Investigación Sanitaria de la Fundación
 Jiménez Díaz
 Universidad Autónoma de Madrid

<120> PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1 PARA SU USO EN COMPLICACIONES CRÓNICAS
 DE LA DIABETES

<130> 900284

<160> 8

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> "kinase inhibitory region" de la proteína SOCS1 murina

<400> 1

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

<210> 2
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> "kinase inhibitory region" de la proteína SOCS1 humana

<400> 2

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

<210> 3
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> péptido mutado (Mut)

<400> 3

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

<210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> secuencia de permeabilidad

<400> 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg

ES 2 552 587 A2

1	5	10
---	---	----

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> secuencia de permeabilidad

 <400> 5
 Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> secuencia de permeabilidad

 <400> 6
 Arg Arg Gln Arg Arg Thr Ser Lys Leu Met Lys Arg
 1 5 10

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> secuencia de permeabilidad

 <400> 7
 Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Lys
 1 5

<210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> secuencia de permeabilidad

 <400> 8
 Arg Arg Arg Arg Arg Arg
 1 5