(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 478**

(51) Int. Cl.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.08.2010** **PCT/US2010/045605**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **17.02.2011** **WO11020091**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.08.2010** **E 10808864 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2017** **EP 2464370**

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

(30) Prioridad:

14.08.2009 US 234151 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

SADEGHI, HOMAYOUN;
TURNER, ANDREW y
DAGHER, SUZANNE

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 624 478 T3

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

DESCRIPCIÓN

Péptidos intestinales vasoactivos modificados

Campo de la invención

La presente invención se refiere a péptidos intestinales vasoactivos (VIP) y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos, que incluyen los VIP que tienen una vida media circulatoria extendida, y los VIP que tienen perfiles de unión al receptor que difieren del péptido maduro no modificado.

Descripción del archivo de texto presentado por vía electrónica

El contenido del archivo de texto presentado por vía electrónica adjunto se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad: Una copia en formato legible por computadora del Listado de Secuencias (nombre de archivo: PHAS_019_01US_SeqList_ST25.txt, fecha registrada: 4 de Agosto, 2010, tamaño del archivo 44 kilobytes).

Antecedentes

El péptido intestinal vasoactivo (VIP) tiene una serie de efectos biológicos que incluyen con respecto a la hemostasia, el sistema inmunológico y el sistema nervioso. Ver, Delgado y otros, The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004).Por ejemplo, el VIP tiene un efecto beneficioso sobre la presión sanguínea y pulmonar y sobre una amplia variedad de afecciones inmunológicas e inflamatorias.VIP tiene un gran potencial como agente activo para la hipertensión pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y asma, por mencionar algunos.

Existe al menos dos receptores para VIP, que incluyen VPAC1 y VPAC2.Estos receptores se unen tanto a VIP como a la molécula relacionada con el polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) hasta cierto grado. Ambos receptores son miembros de la familia de receptores acoplados a la proteína G transmembrana 7.VPAC1 se distribuye, por ejemplo, en el CNS, hígado, pulmón, intestino y linfocitos T.VPAC2 se encuentra, por ejemplo, en el CNS, páncreas, músculo esquelético, corazón, riñón, tejido adiposo, testículo y estómago.

La vida media corta del VIP hace que este péptido sea poco práctico como agente farmacéutico. Ver Pozo D, y otros, Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide: A new therapeutic approach for immune disorders. *Peptides* 28(9):1833-1846 (2007).De hecho, los estudios han demostrado que la vida media del VIP en la sangre es menos de 2 minutos (Domschke *y otros*, 1978, Gut 19:1049-53; Burhol *y otros*, 1978, *Scand J Gastroent* 13:807-813).Además, la multitud de efectos biológicos de VIP puede complicar su desarrollo para cualquier indicación particular. Por lo tanto, se necesitan versiones modificadas de VIP para hacer el agente terapéuticamente práctico, por ejemplo, mediante la extensión de la vida media y/o diseño de moléculas que tengan perfiles convenientes de unión al receptor.

Resumen de la invención

La presente invención se define por las reivindicaciones.

La presente descripción que comprende la invención proporciona unas composiciones farmacéuticas que comprenden los VIP modificados. La descripción que comprende la invención proporciona además métodos para fabricar las moléculas VIP modificadas y el uso de los agentes VIP modificados para el tratamiento de los pacientes. De acuerdo con la descripción que comprende la invención, el VIP modificado exhibe una vida media o persistencia circulatoria extendida en el cuerpo, y/o unión al receptor y/o potencia biológica comparable, y/o perfil de unión al receptor alterado con respecto al VIP no modificado.

En un aspecto, la invención proporciona moléculas de VIP modificadas y composiciones farmacéuticas que comprenden los mismos. Las moléculas VIP modificadas se modifican de forma recombinante o químicamente en el extremo N-terminal mediante la adición de uno o más aminoácidos y/o por fusión a secuencias heterólogas de aminoácidos, para proporcionar una vida media o persistencia circulatoria más prolongada en el cuerpo, potencia biológica comparable, y/o un perfil de unión al receptor modificado. Por ejemplo, en algunas modalidades, el VIP maduro de 28 aminoácidos, que comienza con una His N-terminal, comprende aminoácidos N-terminales adicionales, tales como un solo aminoácido en el extremo N-terminal (es decir, Met). En estas u otras modalidades, el VIP modificado contiene una fusión C-terminal con un péptido similar a la elastina (ELP) como se describe en la presente descripción. Tales moléculas VIP modificadas muestran un aumento de la vida media circulatoria o persistencia en el cuerpo, y una preferencia de unión alterada para VPAC2 sobre VPAC1.

Por ejemplo, un VIP se fusiona (*por ejemplo*, mediante medios recombinantes) al extremo N-terminal de un ELP. En la presente descripción, la histidina del VIP maduro, natural puede estar en el extremo N-terminal. Tales agentes terapéuticos pueden requerir una dosificación significativamente menos frecuente que la contrapartida no fusionada, tal como una dosificación de aproximadamente 1-7 veces por semana (*por ejemplo*, dosis diaria o semanal).

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

En varios casos, el VIP modificado de la invención que tiene una Met en el extremo N-terminal tiene la ventaja de ser obtenible por medios recombinantes, tal como por producción en *E. coli* u otro sistema de expresión, sin procesos de fabricación adicionales posterior a la expresión que expone el N-terminal del VIP natural o deseado.

En otros casos, el VIP puede modificarse químicamente, por ejemplo, mediante la adición de uno o más PEG u otras porciones químicas (por ejemplo, en o cerca del extremo N-terminal), como se describe en detalle en la presente descripción.

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

En otros aspectos, la invención proporciona tratar, mejorar o prevenir una afección en un mamífero. Tales condiciones incluyen una variedad de afecciones cardiovasculares, inmunológicas (por ejemplo, autoinmunes) y neurológicas. Por ejemplo, el VIP modificado puede usarse para ajustar el equilibrio entre efectores proinflamatorios y antiinflamatorios en un paciente, que incluyen un paciente que sufre de una enfermedad autoinmune o una afección inflamatoria. Las indicaciones ilustrativas del VIP modificado incluyen hipertensión, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), diabetes, fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, artritis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD) y asma, entre otros.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión VIP-ELP modificada (M-VIP-ELP1-120, sec. con núm. de ident.:14) que tiene Met en el extremo N-terminal y 120 unidades ELP1 (VPGXG, sec. con núm. de ident.:3) fusionado con el VIP en el extremo C-terminal.

La Figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de una proteína de fusión VIP-ELP modificada (MAA-VIP-ELP1-120, sec. con núm. de ident.:15) que tiene Met-Ala-Ala en el extremo N-terminal, que es activable con el péptido VIP maduro natural, y 120 unidades ELP1 (VPGXG, sec. con núm. de ident.:3) fusionado con el VIP en el extremo C-terminal.

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

La Figura 4 representa pPB1046 que codifica una proteína de fusión M-VIP-ELP1-120 (sec. con núms. de ident.:39 y 40). Iniciadores (P0045, sec. con núm. de ident.:31, P0048, sec. con núm. de ident.:32, y P0065, sec. con núm. de ident.:34) para la construcción del gen recombinante se muestran.

La Figura 5 representa pPB1047 que codifica una proteína de fusión MAA-VIP-ELP1-120 (sec. con núms. de ident.:41 y 42). Iniciadores (P0066, sec. con núm. de ident.:35, P0064, sec. con núm. de ident.:33, P0067, sec. con núm. de ident.:36) para la construcción del gen recombinante se muestran.

La Figura 6 representa pPB1048 que codifica una proteína de fusión ELP1-120-VIP (sec. con núms. de ident.:43 y 44). Iniciadores para construir el gen recombinante (P0068, sec. con núm. de ident.:37, P0069, sec. con núm. de ident.:38) se muestran.

La Figura 7 es un análisis de gel NuPAGE Tris-Acetato al 10 % de proteínas de fusión purificada VIP-ELP, con o sin desnaturalización térmica.

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

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

La Figura 10 muestra el efecto *in vivo* de la proteína de fusión VIP-ELP sobre la presión arterial de la rata. El panel izquierdo muestra la presión arterial sistólica. El panel derecho muestra la presión arterial diastólica VIP-ELP reduce la presión arterial durante más de 12 horas.

La Figura 11 es un mapa de plásmido de pPB1120 (sec. con núm. de ident.:48), que codifica VIP-ELP1-120.

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

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

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

Las Figuras 15A, 15B y 15C muestran el cambio promedio en la presión arterial sistólica, diastólica y media, respectivamente, durante intervalos de 3 horas en ratas inyectadas por vía subcutánea con PB1120 a dosis de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/kg. La Figura 15D muestra la frecuencia cardíaca media de las ratas sujetos durante 3 horas después de la administración de PB1120.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende los VIP modificados. La invención proporciona además el uso de los agentes VIP modificados para el tratamiento de pacientes. De acuerdo con la invención, el VIP exhibe una vida media o persistencia circulatoria extendida en el cuerpo y puede exhibir una unión al receptor o potencia biológica comparable, y/o perfil de unión al receptor alterado con respecto al VIP no modificado. En varios casos, los compuestos de la invención exhiben una frecuencia de dosificación reducida en comparación con sus homólogos no modificados.

Péptido intestinal Vasoactivo

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

VIP tiene un efecto en varias partes del cuerpo. Con respecto al sistema digestivo, VIP puede inducir la relajación del músculo liso (esfínter esofágico inferior, estómago, vesícula biliar), estimular la secreción de agua en el jugo pancreático y la bilis, y causar la inhibición de la secreción de ácido gástrico y la absorción de la luz intestinal. Su papel en el intestino es estimular la secreción de agua y electrolitos, así como dilatar el músculo liso intestinal, dilatar los vasos sanguíneos periféricos, estimular la secreción de bicarbonato pancreático e inhibir la secreción gástrica estimulada por la gastrina. Estos efectos trabajan juntos para aumentar la motilidad. El VIP tiene la función de estimular la secreción de pepsinógeno por las células principales.

VIP se ha encontrado en el corazón y tiene efectos significativos en el sistema cardiovascular. Causa vasodilatación coronaria, además de tener un efecto inotrópico y cronotrópico positivo.

VIP es un péptido inmunomodulador útil para tratar la inflamación y la enfermedad autoinmune de tipo TH1 (Ver Delgado y otros, The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004)).VIP es útil para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (ver la patente de los Estados Unidos 5,972,883, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad).VIP y su péptido relacionado estructuralmente polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la pituitaria (PACAP) tienen importantes efectos terapéuticos en la enfermedad reumática inflamatoria crónica, tales como la osteoartritis (OA) y artritis reumatoide (RA) mediante la regulación negativa tanto de los componentes inflamatorios como autoinmunes de la enfermedad (Juarranz y otros, Vasoactive intestinal peptide modulates proinflammatory mediator synthesis in osteoarthritic and rheumatoid synovial cells, *Rheumatology*, 2004, 43:416-422).Además, el VIP participa en el mantenimiento de la tolerancia inmune regulando el equilibrio entre los efectores proinflamatorios y antiinflamatorios, o induciendo la aparición de células T que tienen una actividad supresora frente a las células T autorreactivas (Pozo y otros, Tuning immune tolerance with vasoactive intestinal peptide:A new therapeutic approach for immune disorders, *Peptide*, 2007, 28(9):1833-1846).

El VIP maduro tiene 28 residuos de aminoácidos con la siguiente secuencia: HSDAVFTDNYTRLRKQMAVKKYLNSILN (sec. con núm. de ident.:13).El VIP resulta del procesamiento de la molécula precursora de 170 aminoácidos prepro-VIP (Se han descrito estructuras de VIP y análogos ilustrativos en las patentes de los Estados Unidos

4,835,252, 4,939,224, 5,141,924, 4,734,400, 4,605,641, 6,080,837, 6,316,593, 5,677,419, 5,972,883, 6,489,297, 7,094,755, y 6,608,174).

Un número de mutaciones para mejorar la estabilidad de los péptidos contra proteasas, etc. se detallan en la literatura (ver Onune y otros, Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability, *Eur.J.Pharm.Biopharm*.2009). Estos péptidos VIP modificados tienen las secuencias de sec. con núm. de ident.:21 (M17L, para evitar la oxidación de Met), sec. con núm. de ident.:22 (K15R, K20R y K21R, para aumentar la estabilidad proteolítica), y sec. con núm. de ident.:23 (N24A y S25A, para aumentar la estabilidad proteolítica/térmica).La presente invención proporciona péptidos VIP modificados que incluyen una o más de estas modificaciones, y con modificaciones VIP adicionales descritas en la presente descripción. Ejemplos de moléculas VIP modificadas incluyen los péptidos VIP modificados de las sec. con núms. de ident.:14-15, 17-27, 40, 42, 44, y 50.

En una modalidad, un VIP modificado comprende la sec. con núm. de ident.:13.Generalmente, los análogos funcionales de VIP incluyen fragmentos funcionales truncados en el extremo N o C terminal en 1 a 10 aminoácidos, que incluyen 1, 2, 3 o hasta 5 aminoácidos (con respecto a la sec. con núm. de ident.:13).Estos análogos funcionales pueden contener de 1 a 5 inserciones, deleciones y/o sustituciones (colectivamente) de aminoácidos con respecto a la secuencia nativa (por ejemplo, sec. con núm. de ident.:13), y reteniendo en cada caso la actividad del péptido (por ejemplo, a través de la unión a VPAC2 y/o VPAC1).Tal actividad puede confirmarse o ensayarse usando cualquier ensayo disponible, que incluyen un ensayo descrito en la presente descripción, y que incluyen cualquier ensayo adecuado para determinar o cuantificar una actividad descrita en Delgado y otros, The Significance of Vasoactive Intestinal Peptide in Immunomodulation, *Pharmacol. Reviews* 56(2):249-290 (2004).En estas u otras modalidades, el componente VIP del VIP modificado de la invención tiene una identidad de al menos aproximadamente 50 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 97 % con la secuencia madura nativa (sec. con núm. de ident.:13).La determinación de la identidad de secuencia entre dos secuencias (por ejemplo, entre una secuencia nativa y un análogo funcional) puede llevarse a cabo usando cualquier herramienta de alineación, que incluyen Tatusova y otros, Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences, *FEMS Microbiol Lett*.174:247-250 (1999).

En un aspecto, la presente invención proporciona una molécula VIP modificada que tiene preferencia de receptor para VPAC2 o VPAC1, en comparación con VIP no modificado (por ejemplo, un péptido que consiste en la secuencia de aminoácidos de sec. con núm. de ident.:13).Por ejemplo, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa para VPAC2 sobre VPAC1 de al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1, Aproximadamente 500:1 o más. En otras modalidades, el VIP modificado puede tener una preferencia de unión relativa para VPAC1 sobre VPAC2 de al menos aproximadamente 2:1, aproximadamente 5:1, aproximadamente 10:1, aproximadamente 25:1, aproximadamente 50:1, aproximadamente 100:1 aproximadamente 500:1, o más. Por ejemplo, en ciertos casos, el VIP modificado activa el receptor VPAC2 esencialmente como VIP humano maduro, no modificado, es decir, con una EC50 dentro de un factor de aproximadamente 2 de VIP humano maduro, no modificado, (sec. con núm. de ident.:13).Sin embargo, este mismo VIP modificado es 50 o 100 veces o más menos efectivo que VIP humano, maduro, no modificado, en la activación del receptor VPAC1.

Tales moléculas VIP modificadas pueden contener regiones N-terminales modificadas, tales como una adición de 1 a aproximadamente 500 aminoácidos a la histidina N-terminal de VIP, que puede incluir la secuencia heteróloga de aminoácidos de mamífero. Por ejemplo, el VIP modificado puede contener una sola metionina en el lado N-terminal de la histidina N-terminal natural del VIP maduro. Esta molécula además se prepara convenientemente en *E. coli* u otro sistema de expresión bacteriana, ya que la metionina no se eliminará por *E coli* cuando el aminoácido adyacente es histidina. Alternativamente, el aminoácido N-terminal puede ser cualquiera de los aminoácidos de origen natural, a saber, alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina y prolina.

La secuencia adicional añadida al N-terminal de VIP puede ser de cualquier secuencia, que incluyen secuencias biológicamente activas y biológicamente inertes de 1 a aproximadamente 100, 1 a aproximadamente 50, 1 a aproximadamente 20, 1 a aproximadamente 10 y 1 a aproximadamente 5 aminoácidos.

El extremo N-terminal del VIP modificado puede tener la estructura M-N, donde M es metionina, y N es el extremo N de la molécula VIP (por ejemplo, sec. con núm. de ident.: 14, FIGURA 1). Esta metionina soporta la traducción de la proteína en una célula huésped bacteriana o eucariótica. Así, el VIP modificado puede hacerse en un sistema biológico, que incluyen sistemas de expresión bacteriano y levadura (por ejemplo, *E. coli*). Aunque la metionina a veces puede eliminarse por metionina aminopeptidasa (MA) en sistemas de expresión bacteriana, la histidina (H) es uno de los residuos menos favorecidos en la posición 2 para MA.

Aun en otros casos, el extremo N-terminal se modifica por fusión con una proteína heteróloga de mamífero, tal como una proteína de mamífero efectiva para extender la vida media de moléculas terapéuticas. Tales secuencias pueden ser secuencias de mamíferos, tales como secuencias de albúmina, transferrina o Fc de anticuerpo. Tales secuencias se describen en Ver la patente de los Estados Unidos núm. 7,238,667 (particularmente con respecto a los conjugados de albúmina), la patente de los Estados Unidos núm. 7,176,278 (particularmente con respecto a los conjugados de transferrina), y la patente de los Estados Unidos núm. 5,766,883.

En otros casos, el VIP es activable por una peptidasa o proteasa, tal como una peptidasa o proteasa endógena. Tales secuencias activables se describen en la Solicitud Internacional Núm. PCT/US2009/068656. Como se usa en la presente descripción, los términos "peptidasa" y "proteasa" son intercambiables. Por ejemplo, el VIP puede diseñarse para ser activable por una dipeptidil peptidasa. Las dipeptidil peptidasas ilustrativas incluyen dipeptidil peptidasa-1 (DPP-I), dipeptidil peptidasa-3 (DPP-III), dipeptidil peptidasa-4 (DPP-IV), dipeptidil peptidasa-6 (DPP-VI), dipeptidil peptidasa-7 DPP-VII), dipeptidil peptidasa-8 (DPP-VIII), dipeptidil peptidasa-9 (DPP-IX), dipeptidil peptidasa-10 (DPP-X). Se conocen secuencias de sustrato para tales dipeptidasas.

El extremo N-terminal de un VIP activable puede tener la estructura Z-N, donde Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se elimina por exposición a dipeptidasa) y N es el extremo N-terminal de VIP.El VIP activable puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-N donde M es metionina, X es Pro, Ala o Ser, y N es el N-terminal del análogo VIP o VIP. De esta manera, M y X serán sensibles a, y se eliminaran por una célula huésped (por ejemplo, *E. coli.),* y/o una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), posteriormente. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es el N-terminal de VIP.X1-X2 es un sustrato para dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá N, el extremo N-terminal deseado del VIP o el análogo VIP (por ejemplo, sec. con núm. de ident.:15, FIGURA 2).En tales modalidades, la proteína puede producirse mediante la expresión de una construcción que codifica M-X1-X2-N (donde M es metionina) en una célula huésped (por ejemplo, *E. coli.*), ya que Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro en la segunda posición indicarán la eliminación de Met, dejando de esta manera X1-X2 en el extremo N-terminal, que puede activarse por una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV) *in vivo.* Tales moléculas VIP activables, que se activan para poseer el extremo N-terminal VIP maduro natural, no muestran preferencia de receptor.

En otro caso, el extremo N-terminal del VIP activable modificado puede tener la estructura M-Z-N, donde M es metionina, Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se elimina por exposición a dipeptidasa) y N es un N-terminal no histina de un VIP activo (VIP modificado. Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-N donde M es metionina; X es Pro, Ala o Ser; y N es un N-terminal no His del VIP activo. De esta manera, M y X serán sensibles a, y eliminaran por una célula huésped (por ejemplo, *E. coli.),* y/o una dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), posteriormente. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; y N es un N-terminal no His del VIP activo. X1-X2 es un sustrato para la dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá N, el extremo N-terminal no His deseado del VIP.

Todavía en otro caso, el extremo N-terminal de un VIP activable modificado puede tener la estructura M-Z-S-N, donde M es metionina; Z es un sustrato para una dipeptidasa (por ejemplo, Z se elimina por exposición a dipeptidasa); N es el N-terminal de VIP maduro (His); y S es uno o más aminoácidos que serán expuestos después de la digestión con dipeptidasa, y que proporcionan un VIP modificado como se describió previamente. Por ejemplo, el VIP activable modificado puede tener una secuencia N-terminal con la fórmula M-X-S-N donde M es metionina, X es Pro, Ala o Ser; N es el N-terminal del VIP maduro; y S es uno o más aminoácidos que serán expuestos después de la digestión con dipeptidasa, y proporcionarán preferencia de receptor. Alternativamente, la secuencia N-terminal del VIP activable puede ser X1-X2-S-N, donde X1 es Gly, Ala, Ser, Cys, Thr, Val o Pro; X2 es Pro, Ala o Ser; N es un N-terminal no His de VIP; y S es uno o más aminoácidos que serán expuestos después de la digestión con dipeptidasa.X1-X2 es un sustrato para la dipeptidasa (por ejemplo, DPP-IV), y la digestión con dipeptidasa expondrá a S.

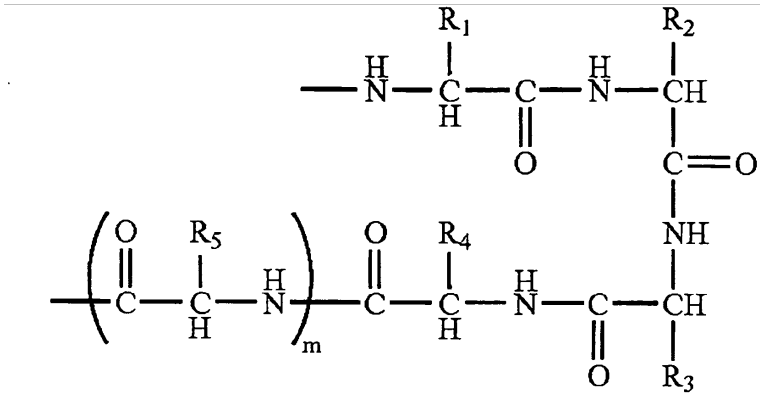
En estos o en otros casos, las modificaciones químicas de N-terminal al extremo N-terminal de VIP pueden proporcionar preferencia al receptor.La modificación química de las proteínas y sus métodos son bien conocidos en la técnica. Las modificaciones químicas ilustrativas no limitativas son PEGilación, metilglioxalación, alquilación reductora, oxidación de ácido perfórmico, succinilación, aminoetilación y lipidación (Clifton, New Protein Techniques, New Jersey:Humana Press, 1985.ISBX.0-89603-126-8,Volumen 3 de Methods in Molecular Biology).Los grupos químicos, tales como la PEGilación, pueden unirse por modificaciones de los grupos cisteína, metionina, histidina, lisina, arginina, triptófano, tirosina, carboxilo se han descritos anteriormente (ver Lundblad, Techniques in Protein Modification, CRC Press, 1995).

Fusiones a Polímeros Bioelásticos

En algunos casos, el VIP de la invención contiene un componente de polímero bioelástico N-terminal y/o C-terminal. Un "polímero bioelástico" puede exhibir una transición inversa con la temperatura.Los polímeros bioelásticos son conocidos y descritos en, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos núm. 5,520,672 de Urry y otros. Los polímeros bioelásticos pueden ser polipéptidos que comprenden unidades elastoméricas de pentapéptidos, tetrapéptidos y/o nonapéptidos (*por ejemplo* "péptidos similares a elastina"). Los polímeros bioelásticos que pueden usarse para llevar a cabo la presente invención se exponen en la Patente de Estados Unidos núm. 4,474,851, que describe una serie de unidades repetitivas de tetrapéptidos y pentapéptidos que pueden usarse para formar un polímero bioelástico .Los polímeros bioelásticos específicos además se describen en la Patente de los Estados Unidos núms. 4,132,746; 4,187,852; 4,500,700; 4,589,882; y 4,870,055. Todavía otros ejemplos de polímeros bioelásticos se exponen en la Patente de los Estados Unidos núm. 6,699,294, Patente de los Estados Unidos núm. 6,753,311, y Patente de los Estados Unidos núm. 6,063,061.

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

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



en donde R_1-R_5 representan cadenas laterales de residuos de aminoácidos 1-5 y m es 0 cuando la unidad repetitiva es un tetrapéptido o 1 cuando la unidad repetitiva es un pentapéptido. Las unidades repetitivas nonapéptido consisten generalmente en tetra y pentapéptidos secuenciales. Los residuos de aminoácidos hidrofóbicos se seleccionan de alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, triptófano y metionina. En muchos casos, el primer residuo de aminoácido de la unidad repetitiva es un residuo de valina, leucina, isoleucina o fenilalanina; el segundo residuo de aminoácido es un residuo de prolina; el tercer residuo de aminoácido es un residuo de glicina; y el cuarto residuo de aminoácido es glicina o un residuo muy hidrofóbico tal como triptófano, fenilalanina o tirosina. Ejemplos particulares incluyen el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly, el tetrapéptido GGVP, el tetrapéptido GGFP, el tetrapéptido GGAP, el pentapéptido es Val-Pro-Gly-Val-Gly, el pentapéptido GVGVP, el pentapéptido GKGVP, el pentapéptido GVGFP, el pentapéptido GFGFP, el pentapéptido GEGVP, el pentapéptido GFGVP y el pentapéptido GVGIP. *Ver, por ejemplo,* la Patente de los Estados Unidos núm. 6,699,294.

En una modalidad, el VIP de la invención contiene un componente ELP C-terminal. El componente ELP comprende o consiste en unidades de péptidos estructurales o secuencias que se relacionan con o derivan de la proteína de elastina. Tales secuencias son útiles para mejorar las propiedades de las proteínas terapéuticas en una o más de la biodisponibilidad, dosis terapéuticamente efectiva y/o frecuencia de administración, acción biológica, compatibilidad de la formulación, resistencia a la proteólisis, solubilidad, vida media u otra medida de persistencia en el cuerpo posterior a la administración, y/o velocidad de eliminación del cuerpo. Ver, por ejemplo, el documento de patente WO 2008/030968.

Cuando el ELP se sitúa en el extremo C-terminal de VIP, pueden realizarse modificaciones adicionales en el extremo N-terminal de VIP, tal como la adición de uno o más aminoácidos, como se describió anteriormente. En casos alternativos, no existen tales modificaciones en el extremo N-terminal de VIP.

El componente ELP se construye a partir de unidades estructurales de tres a aproximadamente veinte aminoácidos, o en algunas modalidades, de cuatro a diez aminoácidos, tales como cinco o seis aminoácidos. La longitud de las unidades estructurales individuales, en un componente ELP particular, puede variar o puede ser uniforme. En ciertas modalidades, el componente ELP se construye de un motivo politetra, polipenta, polihexa, polihepta, polioctа y polinonapéptido de unidades estructurales repetitivas. Las unidades estructurales ilustrativas incluyen unidades definidas por la sec. con núms. de ident.:1-12 (ver más abajo), que pueden emplearse como unidades estructurales repetitivas, que incluyen unidades repetitivas en tándem, o pueden emplearse en alguna combinación, para crear un ELP efectivo para mejorar las propiedades del componente terapéutico. Así, el componente ELP puede comprender o consistir esencialmente en unidades estructurales seleccionadas de las sec. con núms. de ident.:1-12, como se define más abajo.

El componente ELP, que comprende tales unidades estructurales, puede ser de tamaños diversos. Por ejemplo, el componente ELP puede comprender o consistir esencialmente de aproximadamente 10 a aproximadamente 500 unidades estructurales, o en ciertas modalidades de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 unidades estructurales, o en ciertas modalidades de aproximadamente 50 a aproximadamente 150 unidades estructurales, o de

aproximadamente 75 a aproximadamente 130 unidades estructurales, que incluyen una o una combinación de unidades definidas por las sec. con núms. de ident.:1-12. El componente ELP puede comprender aproximadamente 120 unidades estructurales, tales como repeticiones de unidades estructurales definidas la por sec. con núm. de ident.:3 (definido más abajo). Así, el componente ELP puede tener una longitud de aproximadamente 50 a aproximadamente 2000 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 100 a aproximadamente 600 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 residuos de aminoácidos, o de aproximadamente 200 a aproximadamente 400 residuos de aminoácidos.

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

En algunos casos, el componente ELP en el estado sin transición puede tener una forma extendida, relativamente no estructurada y no globular para escapar de la filtración renal. En tales modalidades, los agentes terapéuticos de la invención tienen un peso molecular menor que el corte generalmente reconocido para la filtración a través del riñón, tal como menos de aproximadamente 60 kD, o en algunas modalidades menos de aproximadamente 55, 50, 45 , 40, 30 ó 25 kDa y, sin embargo, persistir en el cuerpo al menos 2 veces, 3 veces, 4 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces o 100 veces más que una contraparte terapéutica desacoplada (por ejemplo, no fusionada o no conjugada).

En estos u otros casos, el componente ELP no impacta esencial o significativamente en la acción biológica del péptido terapéutico. Así, el VIP con fusión de ELP de la presente invención puede exhibir una potencia (acción biológica) que es la misma o similar a su contrapartida no fusionada. El VIP con fusión de ELP de la presente invención puede exhibir una potencia o nivel de acción biológica (por ejemplo, como se prueba *in vitro* o *in vivo)* de 10-100 % de la exhibida por la contrapartida no fusionada en el mismo ensayo. En varias modalidades, el VIP (activado) con la fusión de ELP de la presente invención puede presentar una potencia o nivel de acción biológica (por ejemplo, como se prueba *in vitro* o *in vivo*)de al menos 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 % o más de la exhibida por la contrapartida no fusionada.

En ciertos casos, el componente ELP experimenta una transición de la fase inversa reversible. Es decir, los componentes ELP se desordenan estructuralmente y son altamente solubles en agua por debajo de una temperatura de transición (Tt), pero exhiben una sostenida (intervalo de 2-3°C) transición de fase de desorden a orden cuando la temperatura se eleva por encima de la Tt, conduciendo a la desolvatación y agregación de los componentes ELP. Por ejemplo, el ELP forma polímeros insolubles, cuando alcanza un tamaño suficiente, que puede fácilmente eliminarse y aislarse de la solución por centrifugación. Tal transición de fase es reversible, y los ELP insolubles aislados pueden completamente resolubilizarse en solución tampón cuando la temperatura regresa por debajo de la Tt de los ELP. Así, los agentes terapéuticos de la invención pueden, en algunas modalidades, separarse de otras proteínas contaminantes con alta pureza usando procedimientos de ciclaje de transición inverso, por ejemplo, utilizando la solubilidad dependiente de la temperatura del agente terapéutico o la adición de sal al medio. Pueden usarse ciclos sucesivos de transición de fase inversa para obtener un alto grado de pureza. Además de la temperatura y la fuerza iónica, otras variables ambientales útiles para modular la transición inversa de los agentes terapéuticos incluyen pH, la adición de solutos y disolventes inorgánicos y orgánicos, ionización o modificación química de cadena lateral y presión.

En algunos casos, el componente ELP no experimenta una transición de fase inversa reversible, o no experimenta una transición de ese tipo en un Tt biológicamente relevante, y así las mejoras en las propiedades biológicas y/o fisiológicas de la molécula (como se describió en otra parte en la presente descripción), puede ser enteramente o esencialmente independiente de cualesquiera propiedades de transición de fase. Sin embargo, tales propiedades de transición de fase pueden impartir ventajas prácticas adicionales, por ejemplo, con relación a la recuperación y purificación de tales moléculas.

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

En ciertos casos, los componentes ELP pueden formarse de unidades estructurales, que incluyen pero no limitado a:

(a) el tetrapéptido Val-Pro-Gly-Gly, o VPGG (sec. con núm. de ident.:1);
(b) el tetrapéptido Ile-Pro-Gly-Gly, o IPGG (sec. con núm. de ident.:2);
(c) el pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (sec. con núm. de ident.:3), o VPGXG, donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural, y donde X opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
(d) el pentapéptido Ala-Val-Gly-Val-Pro, o AVGVP (sec. con núm. de ident.:4);
(e) el pentapéptido Ile-Pro-Gly-X-Gly, o IPGXG (sec. con núm. de ident.:5), donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural, y donde X opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;
(e) el pentapéptido Ile-Pro-Gly-Val-Gly, o IPGVG (sec. con núm. de ident.:6);
(f) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-X-Gly, o LPGXG (sec. con núm. de ident.:7), donde X es cualquier residuo de aminoácido natural o no natural, y donde X opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas;

(g) el pentapéptido Leu-Pro-Gly-Val-Gly, o LPGVG (sec. con núm. de ident.:8);
(h) el hexapéptido Val-Ala-Pro-Gly-Val-Gly, o VAPGVG (sec. con núm. de ident.:9);
(I) el octapéptido Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Val-Gly, o GVGVPGVG (sec. con núm. de ident.:10);
(J) el nonapéptido Val-Pro-Gly-Phe-Gly-Val-Gly-Ala-Gly, o VPGFGVGAG (sec. con núm. de ident.:11); y
(K) los nonapéptidos Val-Pro-Gly-Val-Gly-Val-Pro-Gly-Gly, o VPGVGVPGG (sec. con núm. de ident.:12).

Tales unidades estructurales definidas por las sec. con núms. de ident.:1-12 pueden formar unidades estructurales de repetición, o pueden usarse en combinación para formar un componente ELP de acuerdo con la invención. En algunas modalidades, el componente ELP se forma enteramente (o casi completamente) de una o una combinación de (por ejemplo, 2, 3 ó 4) unidades estructurales seleccionadas de sec. con núms. de ident.:1-12.En otras modalidades, se forma al menos 75 %, o al menos 80 %, o al menos 90 % del componente ELP a partir de una o una combinación de unidades estructurales seleccionadas de sec. con núms. de ident.:1-12, y que pueden presentarse como unidades repetitivas.

En algunos casos, los componentes ELP contienen unidades de repetición, que incluyen unidades repetitivas en tándem, del pentapéptido Val-Pro-Gly-X-Gly (sec. con núm. de ident.:3), donde X es como se definió anteriormente, y donde el porcentaje de Val-Pro-Gly-X-Gly (sec. con núm. de ident.:3) unidades de pentapéptido tomadas con respecto a todo el componente ELP (que puede comprender unidades estructurales distintas de VPGXG (sec. con núm. de ident.:3)) es mayor que aproximadamente 75 %, o mayor que aproximadamente 85 %, o mayor que aproximadamente 95 % del componente ELP. El componente ELP puede contener motivos que tienen una repetición de 5 a 15 unidades (por ejemplo, aproximadamente repetición de 10 unidades o aproximadamente de 12 unidades) del pentapéptido de sec. con núm. de ident.:3, con el residuo huésped X que varía entre al menos 2 o al menos 3 de las unidades estructurales dentro de cada repetición. Los residuos huéspedes pueden seleccionarse independientemente, tal como a partir de los aminoácidos V, I, L, A, G y W (y pueden seleccionarse de manera que conserven una propiedad de transición de fase inversa deseada).Los motivos ilustrativos incluyen VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde los residuos huéspedes son V (que pueden presentarse en de 40 % y 60 % de unidades estructurales), G (que puede presentarse en 20 % a 40 % de unidades estructurales y A (que pueden presentarse en 10 % a 30 % de unidades estructurales).El propio motivo de repetición puede repetirse, por ejemplo, de aproximadamente 5 a aproximadamente 20 veces, tal como aproximadamente 8 a 15 veces (por ejemplo, aproximadamente 12 veces), para crear un componente ELP ilustrativo. El componente ELP como se describe en este párrafo puede construirse, por supuesto, a partir de cualquiera de las unidades estructurales definidas por las sec. con núms. de ident.:1-12, o una de sus combinaciones. Un componente ELP ilustrativo se muestra en la Figura 1 fusionado al extremo C-terminal de VIP.

En algunos casos, las unidades de ELP pueden formar una estructura de giro β que proporciona una propiedad similar a la elastina (por ejemplo, transición de fase inversa).Secuencias peptídicas ilustrativas adecuadas para crear una estructura de giro β se describen en la Solicitud de Patente Internacional PCT/US96/05186, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad.Por ejemplo, el cuarto residuo (X) en la secuencia de pentapéptido de elastina, VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), puede alterarse sin eliminar la formación de un giro β.

En ciertos casos, los componentes ELP incluyen repeticiones poliméricas u oligoméricas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde el residuo huésped X es cualquier aminoácido.X puede ser un aminoácido de origen natural o de origen no natural. En algunas modalidades, X se selecciona de alanina, arginina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, serina, treonina, triptófano, tirosina y valina. En algunas modalidades, X es un aminoácido natural distinto de la prolina o cisteína.

El residuo huésped X (por ejemplo, con respecto a la sec. con núm. de ident.:3, u otra unidad estructural de ELP) puede ser un aminoácido no clásico (no codificado genéticamente).Ejemplos de aminoácidos no clásicos incluyen:D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α-amino isobutírico, ácido A-aminobutírico, Abu, ácido 2-amino butírico, γ-Abu, ε-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β-alanina, fluoroaminoácidos, aminoácidos diseñados tales como β-metil aminoácidos, Cα-metil aminoácidos, Nα-metil aminoácidos, y aminoácidos análogos en general.

La selección de X puede ser independiente en cada unidad estructural de ELP (por ejemplo, para cada unidad estructural definida en la presente descripción que tiene un residuo huésped X).Por ejemplo, X puede seleccionarse independientemente para cada unidad estructural como un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada positivamente, un aminoácido que tiene una cadena lateral cargada negativamente, o un aminoácido que tiene una cadena lateral neutra, que incluyen en algunas modalidades, una cadena lateral hidrofóbica.

Aún en otros casos, los componentes ELP pueden incluir repeticiones poliméricas u oligoméricas de los pentapéptidos VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), IPGXG (sec. con núm. de ident.:5) o LPGXG (sec. con núm. de ident.:7), o una de sus combinaciones, donde X es como se definió anteriormente.

En cada caso, las unidades estructurales, o en algunos casos las repeticiones poliméricas u oligoméricas, de las secuencias de ELP pueden separarse por uno o más residuos de aminoácidos que no eliminan el efecto total de la

molécula, es decir, como se describió al impartir ciertas mejoras al componente terapéutico. En ciertos casos, uno o más de tales aminoácidos tampoco eliminan o afectan esencialmente las propiedades de transición de la fase del componente ELP (con relación a la deleción de uno o más aminoácidos).

La estructura de los componentes ELP resultantes puede describirse usando la notación ELPk [X_iY_j-n], donde k designa una unidad de repetición ELP particular, las letras mayúsculas entre corchetes son códigos de aminoácidos de una letra y sus subíndices correspondientes designan la relación relativa de cada residuo huésped X en las unidades estructurales (donde sea aplicable), y n describe la longitud total del ELP en número de las repeticiones estructurales. Por ejemplo, ELP1 [$V_5A_2G_3$-10] designa un componente ELP que contiene 10 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es valina, alanina y glicina en una relación relativa de 5:2:3; ELP1 [$K_1V_2F_1$-4] designa un componente ELP que contiene 4 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es lisina, valina y fenilalanina en una relación relativa de 1:2:1; ELP1 [$K_1V_7F_1$-9] designa un polipéptido que contiene 9 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es lisina, valina, y fenilalanina en una relación relativa de 1:7:1; ELP1 [$V_1A_8G_7$-10] designa un componente ELP que contiene 10 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es valina, alanina, y glicina en una relación relativa de 1:8:7; ELP1 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es exclusivamente valina; ELP1 [V-20] designa un polipéptido que contiene 20 unidades repetitivas del pentapéptido VPGXG (sec. con núm. de ident.:3), donde X es exclusivamente valina; ELP2 [5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido AVGVP (sec. con núm. de ident.:4); ELP3 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido IPGXG (sec. con núm. de ident.:5), donde X es exclusivamente valina; ELP4 [V-5] designa un polipéptido que contiene 5 unidades repetitivas del pentapéptido LPGXG (sec. con núm. de ident.:7), donde X es exclusivamente valina. Tales componentes ELP como se describen en este párrafo pueden usarse en relación con la presente invención para aumentar las propiedades terapéuticas del componente terapéutico.

Además, la Tt es una función de la hidrofobicidad del residuo huésped. Así, variando la identidad de los residuos de huésped y sus fracciones molares, pueden sintetizarse los ELP que exhiben una transición inversa durante un intervalo de 0-100°C.Así, la Tt a una longitud de ELP dada puede disminuirse incorporando una fracción mayor de residuos huésped hidrofóbicos en la secuencia de ELP. Los ejemplos de residuos huésped hidrofóbicos adecuados incluyen valina, leucina, isoleucina, fenilalanina, triptófano y metionina. Además puede usarse tirosina, que es moderadamente hidrofóbica. Por el contrario, la Tt puede aumentarse incorporando residuos, tales como los seleccionados del grupo que consiste en: ácido glutámico, cisteína, lisina, aspartato, alanina, asparagina, serina, treonina, glicina, arginina y glutamina; preferentemente seleccionado de alanina, serina, treonina y ácido glutámico.

El componente ELP en algunos casos se selecciona o diseña para proporcionar una Tt (bajo condiciones fisiológicas) en el intervalo de aproximadamente 10 a aproximadamente 80°C, tal como de aproximadamente 35 a aproximadamente 60°C, o de aproximadamente 38 a aproximadamente 45°C. En algunas modalidades, la Tt es mayor que aproximadamente 40°C o mayor que aproximadamente 42°C, o mayor que aproximadamente 45°C, o mayor de aproximadamente 50°C. La temperatura de transición, en algunas modalidades, está por encima de la temperatura corporal del sujeto o paciente (por ejemplo, >37°C) permaneciendo de ese modo soluble *in vivo*, o en otras modalidades, la Tt está por debajo de la temperatura corporal (por ejemplo, < 37°C) para proporcionar ventajas alternativas, tales como la formación *in vivo* de un fármaco de liberación lenta para la liberación sostenida del agente terapéutico. Ver, por ejemplo, el documento de patente núm. US 2007/0009602.

La Tt del componente ELP puede modificarse variando la longitud de la cadena ELP, ya que la Tt aumenta generalmente con el PM decreciente. Para polipéptidos que tienen un peso molecular > 100.000, la escala de hidrofobicidad desarrollada por Urry y otros, (documento de patente PCT/US96/05186, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad) proporciona un medio para predecir la Tt aproximada de una secuencia ELP específica. Sin embargo, en algunas modalidades, la longitud del componente ELP puede mantenerse relativamente pequeña, manteniendo al mismo tiempo una Tt objetivo, incorporando una fracción mayor de residuos huéspedes hidrofóbicos (por ejemplo, residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales hidrófobas) en la secuencia ELP. Para los polipéptidos que tienen un peso molecular <100.000, la Tt puede predecirse o determinarse mediante la siguiente función cuadrática: $Tt = M_0 + M_1X + M_2X^2$ donde X es el PM de la proteína de fusión, y M_0 = 116,21; M_1 = -1,7499; M_2 = 0,010349.

Mientras la Tt del componente ELP, y por lo tanto del componente ELP acoplado a un componente terapéutico, se afecta por la identidad y la hidrofobicidad del residuo huésped, X, además pueden afectarse las propiedades adicionales de la molécula. Tales propiedades incluyen, pero no se limitan a solubilidad, biodisponibilidad, persistencia, vida media, potencia y seguridad de la molécula.

En la sección de Ejemplos más abajo, se ve que el agente VIP acoplado a ELP retiene una cantidad significativa de la actividad biológica del VIP nativo, con relación a las formas no fusionadas de VIP. Además, se demuestra que los ELP exhiben largas vidas medias. De manera correspondiente, pueden usarse los ELP de acuerdo con la invención para aumentar esencialmente (por ejemplo, en más de 10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 100 %, 200 % o más, en modalidades específicas) la vida media de VIP, según se conjuga con un ELP, en comparación con la vida media de la forma libre (no conjugada) del agente terapéutico. El VIP modificado que tiene vida media circulatoria extendida puede administrarse de

1 a aproximadamente 10 veces por semana, tal como de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 3 veces por semana. La composición VIP o composición farmacéutica modificada que comprende la misma puede administrarse aproximadamente una vez al día, o aproximadamente cada dos días, o aproximadamente cada tercer día, o aproximadamente una vez a la semana (es decir, una vez por semana).

Conjugación y Acoplamiento

Una proteína de fusión VIP producida de forma recombinante, de acuerdo con ciertos casos de la descripción incluye el componente de fusión (por ejemplo, ELP) y un VIP o un análogo de VIP asociado entre sí por fusión genética. Por ejemplo, la proteína de fusión puede generarse mediante la traducción de un polinucleótido que codifica VIP o un análogo de VIP clonado en el marco con el componente ELP.

En algunos casos, el componente ELP y VIP o un análogo de VIP pueden fusionarse usando un péptido enlazador de varias longitudes para proporcionar una mayor separación física y permitir una mayor movilidad espacial entre las porciones fusionadas, y así maximizar la accesibilidad de VIP o un análogo de VIP, por ejemplo, para unirse a su receptor afín. El péptido enlazador puede consistir en aminoácidos que son flexibles o más rígidos. Por ejemplo, un enlazador flexible puede incluir aminoácidos que tienen cadenas laterales relativamente pequeñas, y que pueden ser hidrofílicas. Sin limitación, el enlazador flexible puede comprender residuos de glicina y/o serina. Los enlazadores más rígidos pueden contener, por ejemplo, cadenas laterales de aminoácidos más estéricamente obstaculizantes, tales como (sin limitación) tirosina o histidina. El enlazador puede ser menos de aproximadamente 50, 40, 30, 20, 10 o 5 residuos de aminoácidos. El enlazador puede unirse covalentemente a y entre VIP o un análogo de VIP y un componente ELP, por ejemplo, a través de fusión recombinante.

El enlazador o espaciador de péptido puede ser escindible por proteasa o no escindible. A manera de ejemplo, los espaciadores de péptidos escindibles incluyen, sin limitación, una secuencia de péptidos reconocida por proteasas (*in vitro* o *in vivo*) de tipo variable, tales como Tev, trombina, factor Xa, plasmina (proteasas de la sangre), metaloproteasas, catepsinas (por ejemplo, GFLG, sec. con núm. de ident.:47, etc.), y proteasas encontradas en otros compartimentos corporales. En algunas modalidades que emplean enlazadores escindibles, la proteína de fusión puede ser inactiva, menos activa o menos potente como una fusión, que se activa después de la escisión del espaciador *in vivo.* . Alternativamente, puede emplearse cuando el agente terapéutico es suficientemente activo como un espaciador de fusión, no escindible. El espaciador no escindible puede ser de cualquier tipo adecuado, que incluyen, por ejemplo, porciones de espaciador no escindible que tienen la fórmula [(Gly)n-Ser]m, donde n es de 1 a 4, inclusive, y m es de 1 a 4, inclusive. Alternativamente, podría emplearse una secuencia corta de ELP diferente de la cadena principal de ELP en lugar de un enlazador o espaciador, mientras se logra el efecto necesario.

Aun en otros casos, el agente terapéutico es una fusión recombinante que tiene un componente terapéutico flanqueado en cada extremo por un componente de ELP. Al menos uno de dichos componentes ELP puede unirse a través de un espaciador escindible, de manera que el componente terapéutico es inactivo, pero se activa in vivo por eliminación proteolítica de un solo componente ELP. Siendo activa la fusión ELP sola resultante, y que tiene una vida media mejorada (u otra propiedad descrita en la presente descripción) in vivo.

En otros casos, la presente descripción proporciona conjugados químicos de un VIP o un análogo de VIP y el componente ELP. Los conjugados pueden hacerse acoplando químicamente un componente ELP a VIP o un análogo de VIP por cualquier número de métodos bien conocidos en la técnica (Ver por ejemplo Nilsson y otros, 2005, Ann Rev Biophys Bio Structure 34:91-118).En algunos casos, el conjugado químico puede formarse al unir covalentemente VIP o un análogo de VIP al componente de ELP, directamente o a través de una porción del enlazador corto o largo, a través de uno o más grupos funcionales sobre el componente proteínico terapéutico, por ejemplo, amina, carboxilo, fenilo, tiol o hidroxilo, para formar un conjugado covalente. Pueden usarse varios enlazadores convencionales, por ejemplo, diisocianatos, diisotiocianatos, carbodiimidas, ésteres de bis (hidroxisuccinimida), ésteres de maleimida-hidroxisuccinimida, glutaraldehído y similares.

Los espaciadores químicos no peptídicos pueden ser adicionalmente de cualquier tipo adecuado, que incluyen, por ejemplo, los enlazadores funcionales descritos en Bioconjugate Techniques, Greg T. Hermanson, publicado por Academic Press, Inc., 1995, y los especificados en CrossLinking Reagents Technical Handbook, disponibles de Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, Illinois), cuyas descripciones se incorporan como referencia en su totalidad. Los espaciadores químicos ilustrativos incluyen ligandos homobifuncionales que pueden unirse a grupos amina de Lys, así como enlazadores heterobifuncionales que pueden unirse a Cys en un extremo, y a Lys en el otro extremo.

En algunos casos, los componentes ELP relativamente pequeños (por ejemplo, componentes ELP de menos de aproximadamente 30 kDa, 25 kDa, 20 kDa, 15 kDa, o 10 kDa), que no hacen transición a temperatura ambiente (o temperatura del cuerpo humano, por ejemplo, Tt >37°C), se acoplan o reticulan químicamente. Por ejemplo, dos componentes ELP relativamente pequeños, que tienen las mismas o diferentes propiedades, pueden acoplarse químicamente. Tal acoplamiento, en algunos casos, puede tener lugar *in vivo*, mediante la adición de un solo residuo de cisteína en o alrededor del extremo C-terminal de ELP. Tales componentes ELP pueden fusionarse cada uno a uno o más componentes terapéuticos, para aumentar la actividad o avidez en el objetivo.

Polinucleótidos, Vectores, Células Huéspedes y Métodos de Producción

En otro aspecto, la descripción proporciona polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica el VIP modificado de la invención.Tales polinucleótidos pueden adicionalmente comprender, además secuencias que codifican VIP o análogos de VIP y secuencias de fusión, uno o más elementos de control de expresión. Por ejemplo, el polinucleótido puede comprender uno o más promotores o mejoradores de la transcripción, sitios de unión ribosómicos, señales de terminación de la transcripción y señales de poliadenilación, como elementos de control de la expresión. El polinucleótido puede insertarse dentro de cualquier vector adecuado, el cual puede contenerse dentro de cualquier célula huésped adecuada para la expresión, tal como *E. coli.*

Generalmente, un vector que comprende el polinucleótido puede introducirse en una célula para la expresión del agente terapéutico. El vector puede permanecer episomal o volverse integrado cromosómicamente, siempre que pueda transcribirse el inserto que codifica el agente terapéutico. Los vectores pueden construirse mediante la tecnología de ADN recombinante estándar. Los vectores pueden ser plásmidos, fagos, cósmidos, fagémidos, virus o cualquier otro tipo conocido en la técnica, que se usan para replicación y expresión en células procarióticas o eucariotas. Un experto en la técnica apreciará que una amplia variedad de componentes conocidos en la técnica (tales como elementos de control de expresión) pueden incluirse en tales vectores, que incluyen una amplia variedad de señales de transcripción, tales como promotores y otras secuencias que regulan la unión de la ARN polimerasa sobre el promotor. Cualquier promotor conocido por ser efectivo en las células en las que se expresará el vector puede usarse para iniciar la expresión del agente terapéutico. Los promotores adecuados pueden ser inducibles o constitutivos.

En ciertos casos, el VIP modificado se expresa a partir de *E. coli* u otro sistema de expresión bacteriano. *E. coli* generalmente no eliminará la metionina de N-terminal durante la expresión, de manera que la molécula VIP modificada mantiene la especificidad del receptor. Pueden emplearse otros sistemas de expresión de acuerdo con la invención, que incluyen sistemas de expresión de levadura, sistemas de expresión de células de mamífero y sistemas de baculovirus.

La proteína terapéutica, cuando se emplean secuencias de fusión de ELP, puede recuperarse por ciclaje de temperatura inversa. Específicamente, como se describió anteriormente, el componente ELP experimenta una transición de fase inversa reversible. Es decir, los componentes ELP se desordenan estructuralmente y son altamente solubles en agua por debajo de una temperatura de transición (Tt), pero exhiben una sostenida (intervalo de 2-3°C) transición de fase de desorden a orden cuando la temperatura se eleva por encima de la Tt, conduciendo a la desolvatación y agregación de los componentes ELP. Por ejemplo, el ELP forma polímeros insolubles, cuando alcanza un tamaño suficiente, que puede fácilmente eliminarse y aislarse de la solución por centrifugación. Tal transición de fase es reversible, y los ELP insolubles aislados pueden completamente resolubilizarse en solución tampón cuando la temperatura regresa por debajo de la Tt de los ELP. Así, los agentes terapéuticos de la invención pueden, en algunas modalidades, separarse de otras proteínas contaminantes con alta pureza usando procedimientos de ciclaje de transición inverso, por ejemplo, utilizando la solubilidad dependiente de la temperatura del agente terapéutico o la adición de sal al medio. Pueden usarse ciclos sucesivos de transición de fase inversa para obtener un alto grado de pureza. Además de la temperatura y la fuerza iónica, otras variables ambientales útiles para modular la transición inversa de los agentes terapéuticos incluyen pH, la adición de solutos y disolventes inorgánicos y orgánicos, ionización o modificación química de cadena lateral y presión.

Composiciones farmacéuticas y Métodos de Administración

La presente invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden una cantidad efectiva del VIP modificado de la invención (como se describió anteriormente) junto con un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones farmacéuticas son efectivas para tratar o mejorar, por ejemplo, enfermedad autoinmune o inflamatoria, como se describe en la presente descripción.

Los agentes terapéuticos de la invención pueden administrarse per se así como en varias formas que incluyen ésteres, sales y otros derivados fisiológicamente funcionales farmacéuticamente aceptables de estos. En tales formulaciones farmacéuticas, los agentes terapéuticos pueden usarse exclusivamente, o juntos (que incluyen formulados con) otros ingredientes terapéuticos, tales como agentes antiinflamatorios o inmunosupresores.

Los portadores deben ser farmacéuticamente aceptables en el sentido de que son compatibles con los otros ingredientes de la formulación y no son indebidamente perjudiciales para el receptor de estos.

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

Las formulaciones que comprenden el agente terapéutico de la presente invención pueden presentarse convenientemente en formas de dosificación unitaria y pueden prepararse por cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Tales métodos incluyen generalmente la etapa de poner los agentes terapéuticos en asociación con un portador que constituye uno o más ingredientes accesorios. Típicamente, las formulaciones se

preparan al poner uniformemente e íntimamente el agente terapéutico en asociación con un portador líquido, un portador sólido finamente dividido, o ambos, y después, si es necesario, moldear el producto en formas de dosificación de la formulación deseada.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa del agente terapéutico, que es preferentemente isotónico con la sangre del receptor (por ejemplo, solución salina). Tales formulaciones pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes u otros sistemas de micropartículas que se diseñan para dirigir el agente terapéutico a la circulación o a uno o más órganos. Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitaria o multidosis.

Además de los ingredientes mencionados anteriormente, las formulaciones de esta invención pueden incluir además uno o más ingredientes accesorios seleccionados de diluyentes, tampones, agentes saborizantes, desintegrantes, agentes tensioactivos, espesantes, lubricantes, conservantes (que incluyen antioxidantes) y similares.

Aunque un experto en la técnica puede determinar la dosis deseable en cada caso (que incluyen una dosis unitaria para la administración de liberación lenta), una dosis adecuada del agente terapéutico para el logro del beneficio terapéutico, puede estar, por ejemplo, en una intervalo de aproximadamente 1 microgramo (µg) a aproximadamente 100 miligramos (mg) por kilogramo de peso corporal del receptor, o en un intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 50 mg por kilogramo de peso corporal, o en un intervalo de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 10 mg por kilogramo de peso corporal. La dosis deseada puede presentarse como una dosis o dos o más subdosis administradas a intervalos apropiados durante todo el período de dosificación (por ejemplo, una semana, dos semanas, etc...).Estas subdosis pueden administrarse en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, que contienen de aproximadamente 10 µg a aproximadamente 500 mg, o de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 200 mg, o de aproximadamente 50 µg a aproximadamente 100 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria. Alternativamente, si la afección del receptor así lo requiere, las dosis pueden administrarse como una infusión continua.

El modo de administración y las formas de dosificación afectarán por supuesto la cantidad terapéutica del agente terapéutico activo peptídico que es deseable y efectivo para una aplicación de tratamiento dado. Por ejemplo, las dosis administradas oralmente pueden ser al menos dos veces, por ejemplo, 2-10 veces, los niveles de dosificación usados en los métodos de administración parenteral. Las formulaciones de liberación lenta además permitirán que se suministre significativamente más agente terapéutico, de manera que el agente tenga una liberación sostenida durante el tiempo.

El VIP que circula en el plasma de individuos normales proviene de las fibras nerviosas que contienen VIP en el tracto gastrointestinal y además refleja el exceso de péptidos de los nervios vasculares (Cugini y otros, 1991, *Reg Pept* 34:141-8).Al igual que la mayoría de las proteínas vasoactivas, VIP tiene una vida media relativamente corta. La vida media del VIP en la sangre es menos de 2 minutos (Domschke *y otros*, 1978, Gut 19:1049-53; Burhol y otros, 1978, Scand J Gastroent 13:807-813).Una ventaja de los VIP modificados descritos en la presente descripción es la vida media extendida o la persistencia en el cuerpo. De acuerdo con ciertos casos de la invención, el VIP se puede administrarse de 1 a aproximadamente 10 veces por semana, tal como de 1 a aproximadamente 5, o de 1 a aproximadamente 3 veces por semana. La composición VIP o composición farmacéutica modificada que comprende la misma puede administrarse aproximadamente una vez al día, o aproximadamente cada dos días, o aproximadamente cada tercer día, o aproximadamente una vez a la semana.

En ciertas modalidades, el VIP modificado se administra por vía parenteral, tal como por inyección subcutánea o intramuscular. La administración puede ser una dosis unitaria del VIP modificado como se describe en la presente descripción.

El VIP modificado, cuando se administra por vía parenteral, puede administrarse una vez al día, o una o dos veces por semana, o de una a cinco veces al mes. En estas modalidades, el VIP modificado puede administrarse como un péptido de fusión soluble, que persiste en la circulación, como se describe en la presente descripción, para proporcionar actividad sostenida con una administración relativamente infrecuente. El VIP modificado puede administrarse como fármaco de liberación lenta, como además se describe en la presente descripción, para proporcionar una liberación sostenida del péptido de fusión en la circulación durante el tiempo. Ver el documento de patente US 2007/0009602, que se incorpora en la presente descripción como referencia.

Métodos de Uso

En otros aspectos, la descripción que comprende la invención proporciona tratar, mejorar o prevenir una afección en un mamífero. Tales afecciones incluyen una variedad de afecciones cardiovasculares, inmunológicas (por ejemplo, autoinmunes) y neurológicas. Por ejemplo, el VIP modificado puede usarse para ajustar el equilibrio entre efectores proinflamatorios y antiinflamatorios en un paciente, que incluyen un paciente que sufre de una enfermedad autoinmune o una afección inflamatoria. Las indicaciones ilustrativas para el VIP modificado incluyen hipertensión, fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía, diabetes, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), artritis, enfermedad inflamatoria intestinal (IBD), enfermedad de Parkinson, traumatismo cerebral y asma.

La invención proporciona así un método para tratar una variedad de afecciones, que incluyen afecciones caracterizadas

por autoinmunidad o inflamación. El método comprende administrar una cantidad efectiva del VIP modificado de la invención a un paciente necesitado.

Hipertensión

En varias modalidades descritas en la presente descripción, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir la hipertensión en un paciente necesitado, que comprende administrar una cantidad efectiva del VIP modificado. Las formas de hipertensión tratables con los VIP modificados de la presente invención incluyen hipertensión pulmonar, hipertensión esencial no controlada e hipertensión resistente.

La hipertensión pulmonar es una enfermedad relativamente rara, pero altamente mortal, caracterizada por hipertensión arterial pulmonar progresiva y aumento del engrosamiento de las arterias y arteriolas pulmonares más pequeñas, culminando en el fallo del ventrículo derecho (RV) (Said *y otros*, 2007, *Circulation* 115:1260-8).VIP se ha relacionado con la circulación pulmonar y sistémica. Con respecto al lecho vascular pulmonar y sus alteraciones en la hipertensión pulmonar, el VIP relaja el músculo liso vascular pulmonar de varias especies de mamíferos *in vitro,* neutraliza o atenúa las acciones de la endotelina y otros vasoconstrictores, reduce la vasoconstricción pulmonar hipóxica e inhibe la proliferación músculo liso vascular pulmonar de pacientes con hipertensión pulmonar. Además, VIP es un cotransmisor del sistema fisiológico no adrenérgico, no colinérgico de la relajación del músculo liso vascular pulmonar. Además, se ha observado que los nervios que contienen VIP, normalmente abundantes en la arteria pulmonar, están ausentes en las arterias pulmonares de pacientes con hipertensión pulmonar, y la inhalación del péptido tiene un efecto terapéutico beneficioso sobre estos pacientes (Petkov *y otros*, 2003, *J. Clin Invest*.111:1339-1346).Por último, los estudios han demostrado que la terapia de reemplazo de VIP en ratones $VIP^{-/-}$ es capaz de prevenir o al menos retardar la progresión de los principales cambios patológicos en la hipertensión pulmonar (Said y otros, 2007, *Circulation* 115:1260-8).Así, puede esperarse que la aplicación de VIP a pacientes con hipertensión pulmonar resulte en una mejora sustancial de los parámetros hemodinámicos y pronósticos de la enfermedad (Petkov *y otros*, 2003, *J. Clin Invest*.111:1339-1346).
La hipertensión esencial no controlada es la presión arterial que es consistentemente más alta de lo normal cuando no se puede encontrar ninguna causa para la presión arterial alta. La hipertensión esencial es el tipo de hipertensión más prevalente, que afecta al 90-95 % de los pacientes hipertensos (Carretero *y otros*, 2000, *Circulation* 101:329-35) y los expertos creen que se causa por varios factores no descubiertos. Las concentraciones de VIP se disminuyen en ratas hipertensivas esenciales, propensas a un accidente cerebrovascular (Mori *y otros*, 1993, *Jpn Heart J.* 34:785-94) y el uso de VIP humano con liposomas estabilizados estéricamente puede normalizar la presión arterial sistémica en hámsteres espontáneamente hipertensos (Onyuksel *y otros*, 2006, *Peptides* 27:2271-5).

La hipertensión resistente es una forma de presión arterial alta que no responde al tratamiento (*es decir,* la presión arterial sigue siendo alta incluso cuando se administra una combinación de fármacos).Las causas del mal control de la presión arterial son numerosas. Las causas más probables son la sobrecarga de volumen debido al exceso de ingesta de sodio, la intolerancia a los medicamentos, el incumplimiento y la hipertensión secundaria (Graves JW, 2000, *Mayo Clin Prac* 75:278-84).Como potente vasodilatador sistémico, el VIP tiene utilidad para el tratamiento y la prevención de la hipertensión en pacientes que producen las características de la hipertensión resistente.

Enfermedad cardíaca

En casos adicionales, la presente descripción que comprende la invención proporciona métodos para tratar o prevenir enfermedades del corazón en un paciente necesitado, que comprende administrar una cantidad efectiva del VIP modificado. Las formas de enfermedad cardíaca tratables con los VIP modificados de la presente invención incluyen fibrosis miocárdica, insuficiencia cardíaca y cardiomiopatía.

Los cambios en la síntesis y secreción de VIP en el corazón parecen desempeñar un papel en la patogénesis de varias enfermedades, tales como la insuficiencia cardíaca y la fibrosis miocárdica (Dvoráková MC, 2005, Drug News Perspect.18:387-91).Por ejemplo, la concentración de VIP se disminuye significativamente tanto en tejidos de pacientes con cardiomiopatía como en tejido cardíaco de modelos animales de insuficiencia cardíaca (Unverferth y otros, 1986, *J. Lab Clin Med* 108:11-16).Además, la degradación del VIP se aumenta en los corazones con fibrosis y, consecuentemente, disminuye la concentración de VIP de miocardio. Así, VIP disminuido parece ser un factor importante en la patogénesis de la enfermedad (Ye *y otros*, 2003, *Acta Physiol Scand* 179:353-60) y las concentraciones de VIP disminuidas se asocian con un empeoramiento progresivo de la insuficiencia cardíaca. El uso del inhibidor de vasopeptidasa omapatrilat, que se sabe que disminuye la velocidad de aclaramiento metabólico de VIP, resultó en una disminución de la presión arterial sistólica, así como una disminución de la fibrosis miocárdica en comparación con el control (Ye *y otros*, 2004, *Eur J Pharmacol* 485:235-42).Además se informó un efecto protector del VIP en el miocardio isquémico y reperfundido (Kalfin *y otros*, 1994, *J Pharmacol Exp Ther* 268:952-8).Por lo tanto, puede esperarse que la aplicación de los VIP modificados de la presente invención tenga un efecto beneficioso en una variedad de afecciones patológicas, que incluyen insuficiencia cardíaca, cardiomiopatía y fibrosis miocárdica.

Diabetes Mellitus Tipo 2

En casos adicionales, la presente descripción proporciona métodos para tratar o prevenir la diabetes en un paciente necesitado, que comprende administrar una cantidad efectiva del VIP modificado. Específicamente, los VIP modificados de la presente invención tienen utilidad para el tratamiento y prevención de la diabetes mellitus tipo 2.

Los estudios han demostrado que el contenido de VIP del antro gástrico y duodeno de ratas diabéticas es significativamente menor que el de ratas normales (Gozes *y otros*, 2004, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:623-640).Los bajos niveles tisulares de VIP en el tracto gastroduodenal pueden contribuir en parte a la motilidad intestinal anormal observada en pacientes diabéticos (Adeghate *y otros*, 2001, *Arch Phys Bioc* 109:246-51).VIP estimula la secreción de insulina de células de insulinoma, islotes pancreáticos de ratón y páncreas perfundido de rata.La activación de VPAC1 se ha implicado en la elevación de la producción de glucosa (Gozes y otros, 2004, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 18:623-640), mientras que el receptor VPAC2 de VIP se expresa en las células β de los islotes pancreáticos y su activación provoca una elevación del AMP cíclico y la estimulación de la secreción de insulina (DeSouza *y otros*, 2009, *Nature Reviews* 8:361-7).Además, el VIP estimula la secreción de glucagón en seres humanos, resultando la liberación de glucosa del hígado. En conjunto, estos estudios revelan que el VIP tiene amplios efectos directos sobre el metabolismo de la glucosa. Como consecuencia, puede esperarse que VIP y las formas modificadas de VIP, tales como los péptidos de fusión descritos en la presente descripción, sean una terapia útil para el tratamiento y la prevención de la diabetes tipo 2.

Preferencia de Receptor VPAC2

En algunas modalidades, tales como donde el VIP modificado tiene una mayor preferencia por VPAC2 en comparación con VIP no modificado, el VIP modificado puede reducir las respuestas inflamatorias, tales como las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, en un paciente. En algunas de tales modalidades, el VIP modificado reduce el desarrollo de células T autorreactivas. En estas modalidades, el paciente puede tener una o más afecciones definidas por inflamación del tipo TH1 o autoinmunidad TH1, tales como artritis (que incluye RA), Enfermedad Inflamatoria Intestinal (por ejemplo, Enfermedad de Crohn), diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, rechazo de trasplante, síndrome de Sjogren, pancreatitis, uveoretinitis, queratitis y choque séptico.

Preferencia de Receptor VPAC1

En algunas modalidades, tales como donde el VIP modificado tiene una mayor preferencia por VPAC1 en comparación con VIP no modificado, el VIP modificado puede promover respuestas inflamatorias TH1, tales como respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, en unos pacientes. En estas modalidades, el paciente puede tener una o más afecciones asociadas con la inmunidad de TH2, tales como asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD).
La COPD es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias, que afecta tantos como 8% de los individuos en las naciones industrializadas. Existe un aumento en el número de mujeres y hombres que padecen COPD. La hipertensión pulmonar es un síntoma común de obstrucción crónica del flujo de aire, pero los mecanismos precisos de aumento de la resistencia vascular son poco claros. Las posibles causas de la hipertensión pulmonar en la COPD incluyen la destrucción enfisematosa del lecho capilar, la remodelación de los vasos pulmonares y la vasoconstricción pulmonar hipóxica.

VIP es una de las moléculas más abundantes que se encuentran en el tracto respiratorio. Debido a sus propiedades antiinflamatorias y broncodilatadoras, se ha propuesto como un tratamiento novedoso para la COPD y el asma. Aunque la regulación positiva de VPAC1 es dominante, tanto VPAC1 como VPAC2 son necesarios para la señalización anti inflamatoria óptima (Burian *y otros*, 2010, *Peptides* 31:603-8).En consecuencia, puede esperarse que el tratamiento con VIP y formas modificadas de VIP, tales como los péptidos de fusión descritos en la presente descripción, ayuden a disminuir la inflamación crónica en el pulmón de pacientes con COPD y asma.

La presente invención se ilustra además por los siguientes ejemplos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Clonación de las construcciones VIP-ELP

La secuencia de ADN del péptido VIP fue como se describió en Simoncsits y otros(Synthesis, cloning and expression in Escherichia coli of artificial genes coding for biologically active elongated precursors of the vasoactive intestinal polypeptide, *Eur.J.Biochem*.1988, 178(2):343-350, que se incorpora en la presente descripción como referencia en su totalidad, excepto que el residuo 17 fue la metionina nativa y no tenía ninguna de las extensiones C-terminales descritas (Ver sec. con núm. de ident.:16).

Se prepararon dos variantes iniciales, una con una metionina en el extremo N-terminal, debido al codón de inicio ATG requerido, (PB1046, sec. con núm. de ident.:17) y uno con el tripéptido MAA en el extremo N-terminal (PB1047, sec. con núm. de ident.: 18). La metionina sobre PB1046 normalmente se eliminaría por metionina aminopeptidasa (MA), pero como la histidina es el segundo residuo y uno de los aminoácidos menos favorecidos en esta posición para MA, la

metionina no se elimina.La metionina sobre PB1047 se eliminó para dejar AA, que después puede eliminarse *in vitro* o *in vivo* por DPPIV para dar la histidina como residuo N-terminal. La secuencia de ADN de VIP se clonó en el vector pPB1031 (ver la Figura 3) que porta la secuencia de ADN de ELP1-120 para dar un casete de expresión bajo el control del promotor T7.

Los oligonucleótidos sintéticos P0045 (sec. con núm. de ident.:31), P0048 (sec. con núm. de ident.:32), P0064 (sec. con núm. de ident.:33) y P0065 (sec. con núm. de ident.:34) se alinearon juntos, se digirieron con la enzima de restricción Xbal y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción Xbal/Kpnl para dar el plásmido de expresión pPB1046 (ver la Figura 4).

Los oligonucleótidos sintéticos P0066 (sec. con núm. de ident.:35), P0064 (sec. con núm. de ident.:33), P0067 (sec. con núm. de ident.:36) y P0065 (sec. con núm. de ident.:34) se alinearon juntos, se digirieron con la enzima de restricción Xbal y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción Xbal/Kpnl para dar el plásmido de expresión pPB1047 (ver la Figura 5).

Además, y suponiendo que el extremo N-terminal no fue un requisito absoluto para la actividad, además se hizo una fusión C-terminal (ver la Figura 6).Los oligonucleótidos sintéticos P0068 (sec. con núm. de ident.:37) y P0069 (sec. con núm. de ident.:38) se alinearon juntos y se ligaron en el plásmido pPB1031 que se había digerido con las enzimas de restricción BglI/NheI para dar el plásmido de expresión pPB1048.

Ejemplo 2

Expresión de las construcciones VIP-ELP

La cepa de producción *E.coli* BLR (Novogen) se transformó con los plásmidos pB1046, pPB1047 y pPB1048 y se cultivó en medio rico en frascos de agitación a 37 °C durante la noche. Los sedimentos de las células se resuspendieron en tampón TE pH 8,0, se lisaron a través de un microfluidizador (Microfluidics), se centrifugaron para eliminar el material insoluble y el producto se purificó a partir del lisado soluble resultante mediante "transición" (ref) con la adición de NaCl a 3M. Las muestras se tomaron a través de otras dos rondas de transición para dar las muestras purificadas finales. Estos se analizaron mediante SDS-PAGE y se encontró que PB1046 y PB1047 daban dos bandas (ver la Figura 7).Asumiendo esto fue como resultado de la proteólisis, los cultivos se crecieron de nuevo, pero esta vez, antes de la lisis, se calentaron a 60°C durante 15 minutos. El análisis con gel NuPAGE Tris-Acetato al 10 % indicó que la proteólisis había sido inhibida (ver la Figura 7).

La proteólisis fue, muy probablemente, dentro del péptido y probablemente cerca de la unión del péptido y ELP ya que no se observó ruptura en la fusión C-terminal de PB1048.Es posible prevenir la proteólisis mediante la desnaturalización térmica de las proteasas antes de la lisis de las células, lo que tendería a implicar proteasas periplásmicas en lugar de una proteasa citosólica, o una proteasa citosólica que se activó o se comporta de manera diferente tras la lisis.

Ejemplo 3

Actividad de la proteína de fusión VIP-ELP modificada *in vitro*

Para medir la actividad biológica *in vitro* y la potencia de las proteínas de fusión VIP o VIP-ELP, se usó un bioensayo basado en células. El ensayo mide el aumento de la concentración intracelular de monofosfato cíclico de adenosina (cAMP) en respuesta al tratamiento con proteínas VIP o de fusión VIP-ELP en células de ovario de hámster chino (CHO) que se han manipulado para expresar ya sea el Receptor 2 del Péptido Intestinal Vasoactivo humano (VPAC2) o el Receptor 1 del Péptido Intestinal Vasoactivo humano (VPAC1).Tanto las proteínas VIP como de fusión VIP-ELP pueden estimular la producción de cAMP en estas células, lo que indica que las proteínas de fusión retienen la capacidad de unirse y activar el receptor. Dado que la cantidad de acumulación de cAMP en las células después de la unión y activación del ligando mediada por receptor es directamente proporcional a la cantidad de péptido intacto o proteína de fusión presente, el ensayo puede usarse para determinar la bioactividad y la potencia relativa.

En este ejemplo, se probó la actividad de las proteínas de fusión VIP-ELP PB1046 y PB1047.La construcción PB1046 contiene VIP con una Met en el extremo N-terminal y la construcción PB1047 contiene VIP con Ala-Ala en su extremo N-terminal. Ambas construcciones tienen ELP (1-120) en su extremo C-terminal. En el primer experimento, se probó la actividad de las construcciones usando células CHO que expresan el receptor VPAC2 de VIP. Después de 30 minutos de incubación de varias concentraciones de las proteínas de fusión con la célula, se lisaron las células y se midió la cantidad de cAMP producido usando un kit comercial.PB1047 se trató con DPP-IV antes de la adición a las células. La Figura 8 muestra el resultado. Como se muestra, la proteína de fusión VIP modificada PB1046 es algo más activa que la proteína VIP nativa, mientras que PB1047 es menos activa.

La actividad de PB1046 y PB1047 además se probó usando células CHO que expresan el receptor VPAC1 de VIP. Después de 30 minutos de incubación de varias concentraciones de las proteínas de fusión con células CHO, se lisaron las células y se midió la cantidad de cAMP producido usando un kit comercial.PB1047 se trató con DPP-IV antes de la adición a las células. La Figura 9 muestra el resultado. Esta vez, la proteína de fusión VIP modificada PB1046 es mucho

menos activa que la proteína VIP nativa, mientras que la actividad relativa de PB1047 frente al VIP nativo es aproximadamente la misma que en el ensayo para el receptor VPAC2.Estos resultados sugieren que PB1046 activa selectivamente el receptor VPAC2 sobre el receptor VPAC1.

Ejemplo 4

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

La actividad de la proteína de fusión VIP-ELP modificada PB1047 además se probó *in vivo.* Específicamente, se probaron los efectos de la proteína de fusión VIP-ELP en la presión arterial. Ratas espontáneamente hipertensas se trataron por vía subcutánea con PB1047 (10 mg/kg) o control de tampón y sus presiones arteriales se midieron en varios puntos después de la administración de la proteína de fusión. Se usaron cinco animales para cada grupo y los gráficos muestran el promedio y la desviación estándar.PB1047 redujo significativamente la presión arterial sistólica y diastólica en estos animales durante al menos 12 horas después de la administración (ver la Figura 10), lo que indica que la proteína de fusión VIP-ELP es activa y puede usarse potencialmente como fármacos en el tratamiento de enfermedades relacionadas con VIP.

Ejemplo 5

Proteínas de fusión VIP-ELP adicionales

El tratamiento con DPP IV de PB1047 resultó en la eliminación tanto de AA como HS del extremo N-terminal, y la inactivación del péptido. Por lo tanto, se construyó el plásmido pPB1064, donde el extremo N-terminal se cambió a MAAHG, sec. con núm. de ident.:45, en lugar de MAAHS, sec. con núm. de ident.:46, porque HG es más resistente a DPP IV que HS.

Además se construyó el plásmido pPB1056, que codifica un VIP con un enlazador de carga opuesta (sec. con núm. de ident.:20) basado en la VPGXG, sec. con núm. de ident.:3, repetición antes de ELP.

Ejemplo 6

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

La secuencia de ADN de VIP se clonó en el vector pPB1120 (sec. con núm. de ident.:48) (ver la Figura 11) que lleva la secuencia de ADN de ELP1-120 para dar un casete de expresión bajo el control del promotor T7.A continuación, la cepa de producción *E. coli* BRL se transformó con el plásmido pPB1120 y se cultivó en medio rico como se describió anteriormente. Se purificaron muestras del péptido de fusión VIP-ELP1-120 resultante, PB1120, y se analizaron a través de SDS-PAGE.

La actividad del péptido de fusión PB1120 se probó *in vitro.* La actividad se probó usando un ensayo utilizando células CHO que expresan el receptor de VIP (VPAC1) como se describió anteriormente en el Ejemplo 3.Como muestra la Figura 12, PB1120 fue aproximadamente 1,4 veces menos activo que el péptido VIP nativo en el receptor VPAC1.Por comparación, la construcción PB1046 que contiene un residuo de metionina N-terminal fue aproximadamente 11 veces menos activo que el péptido VIP nativo. En el transcurso de experimentos múltiples, PB1120 estuvo aproximadamente desde 1,4 a 6 veces menos activo que el péptido VIP nativo en el receptor VPAC1.

La Figura 13 ilustra la actividad de PB1120 para el receptor VPAC2.Al igual que los resultados observados para el receptor VPAC1, PB1120 muestra ligeramente menos actividad (-1,5 veces menos) que el péptido VIP nativo para VPAC2.Sin embargo, a diferencia de los resultados observados con VPAC1, PB1046 fue equipotente para VPAC2 en comparación con el péptido nativo. En el transcurso de experimentos múltiples, PB1120 fue aproximadamente desde 1,5 a 7 veces menos activo que el péptido VIP nativo en el receptor VPAC2.

Ejemplo 7

Perfil farmacocinético de la proteína de fusión VIP-ELP modificada PB1120

Además de los ensayos de potencia biológica descritos anteriormente, además se examinó el perfil farmacocinético de la proteína de fusión VIP-ELP PB1120.A los monos se les administró una sola inyección subcutánea (SC) (dosificada a 3 mg/kg) de PB1120 y las concentraciones plasmáticas de fármaco se midieron diariamente a lo largo de una semana. Se usaron tres animales y los gráficos muestran el promedio y la desviación estándar. Más de la mitad de la dosis inicial de PB1120 permaneció en la circulación al día 4 (ver las Figuras 14A y 14B, que ilustran las concentraciones plasmáticas medias de PB1120 después de la administración SC usando ejes lineales y semilogarítmicos, respectivamente).

Basándose en estos datos, parece haber una fase de absorción prolongada después de la administración subcutánea de PB1120, consistente con una absorción lenta desde el sitio de administración. La vida media de eliminación aparente

(t½), basada en la decadencia de las concentraciones plasmáticas, osciló de 9,9 a 45,8 h y probablemente refleja la absorción lenta en lugar de la verdadera eliminación. Estos datos indican que la proteína de fusión VIP-ELP tiene una vida media dramáticamente extendida en comparación con VIP nativo y puede administrarse potencialmente a intervalos extendidos (por ejemplo, puede administrarse aproximadamente una vez al día, aproximadamente cada dos días, aproximadamente cada tercer día, o aproximadamente una vez por semana).

Ejemplo 8

Efectos de la Proteína de Fusión VIP-ELP Modificada PB1120 en la Presión Arterial

Para medir los efectos de la proteína de fusión VIP-ELP modificada PB1120 en la presión arterial sistólica, diastólica y media, se administró a las ratas inyecciones subcutáneas solas de 0,1 mg/kg, 1 mg/kg o 5 mg/Kg de PB1120 y se evaluaron durante intervalos de 3 horas. Las Figuras 15A, 15B y 15C muestran el cambio promedio en la presión arterial sistólica, diastólica y media, respectivamente. La Figura 15D muestra la frecuencia cardíaca promedio durante intervalos de 3 h a continuación de la administración de PB1120.Como demuestran las Figuras 15A-C, las ratas inyectadas con 1 mg/kg o 5 mg/kg de PB1120 mostraron reducciones significativas en la presión arterial sistólica, diastólica y media 9 horas después de la inyección, lo que indica que la proteína de fusión VIP-ELP PB1120 puede administrarse potencialmente para el propósito de tratar o prevenir la hipertensión en individuos afectados.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos en la presente descripción tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por los expertos en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o las pruebas de la presente invención, los materiales y métodos preferidos se describen en la presente descripción.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Sadeghi, Homayoun
Turner, Andrew
Dagher, Suzanne

<120> Péptidos intestinales vasoactivos modificados

<130> PHAS-019/01US

<150> US 61/234,151
<151> 2009-08-14

<160> 50

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Tetrapéptido ELP

<400> 1

```
Val Pro Gly Gly
1
```

<210> 2
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Tetrapéptido ELP

<400> 2

```
Ile Pro Gly Gly
1
```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Pentapéptido ELP

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural o no natural, y donde Xaa opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 3

```
Val Pro Gly Xaa Gly
1               5
```

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Pentapéptido ELP

<400> 4

```
Ala Val Gly Val Pro
1               5
```

<210> 5
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Pentapéptido ELP

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural o no natural, y donde Xaa opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 5

```
Ile Pro Gly Xaa Gly
1               5
```

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Pentapéptido ELP

<400> 6

```
Ile Pro Gly Val Gly
1               5
```

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Pentapéptido ELP

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (4)..(4)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural o no natural, y donde Xaa opcionalmente varía entre repeticiones poliméricas u oligoméricas

<400> 7

```
Leu Pro Gly Xaa Gly
1               5
```

<210> 8
<211> 5

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Pentapéptido ELP

<400> 8

```
Leu Pro Gly Val Gly
1               5
```

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Hexapéptido ELP

<400> 9

```
Val Ala Pro Gly Val Gly
1               5
```

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Octapéptido ELP

<400> 10

```
Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly
1               5
```

<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nonapéptido ELP

<400> 11

```
Val Pro Gly Phe Gly Val Gly Ala Gly
1               5
```

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Nonapéptido ELP

```
Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Gly
1               5
```

<210> 13
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

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

<210> 14
<211> 634
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> M-VIP ELP1-120

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

Val Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly
```

115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630

<210> 15
<211> 636
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> MAA-VIP ELP1-120

<400> 15

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 16
<211> 93
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 16

atggcggccc actctgacgc tgttttcact gacaactaca ctcgtctgcg taaacagatg 60

gctgttaaaa agtacctgaa ctctatcctg aac 93

<210> 17
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1046

<400> 17

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

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

<210> 18
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1047

<400> 18

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

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

<210> 19
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1064

<400> 19

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

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

<210> 20
<211> 51
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA PB1056

<400> 20

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

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

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

Gly Asp Gly
    50
```

<210> 21
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 21

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


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

<210> 22
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 22

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


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

<210> 23
<211> 28
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 23

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


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

<210> 24
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 24

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

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

<210> 25
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ser o Gly
<400> 25

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

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

<210> 26
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 26

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

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

<210> 27
<211> 31
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>VIP : PROTEÍNA MODIFICADA

<220>
<221> CARACT_MISC
<222> (5)..(5)
<223> Xaa puede ser Ser o Gly

<400> 27

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

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

<210> 28
<211> 27
<212> PRT
<213> DESCONOCIDO

<220>
<223> PACAP-27 : PROTEÍNA NATIVA

<400> 28

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

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

<210> 29
<211> 38
<212> PRT
<213> DESCONOCIDO

<220>
<223> PACAP-38: PROTEÍNA NATIVA

<400> 29

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

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

Gln Arg Val Lys Asn Lys
        35
```

<210> 30
<211> 41
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> PACAP: PROTEÍNA MODIFICADA

<400> 30

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

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

Pro Gly Glu Gly Val Pro Gly Asp Gly
        35                  40
```

<210> 31
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0045 : INICIADOR

<400> 31
aattctctag aaataatttt gtttaacttt aagaaggaga tatacatatg cactctgacg 60

<210> 32
<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0048 : INICIADOR

<400> 32
gtagttgtca gtgaaaacag cgtcagagtg catatgtata tctccttctt aaagttaaac 60

aaaattattt ctagag 76

<210> 33
<211> 78
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> P0064: INICIADOR

<400> 33
ctgttttcac tgacaactac actcgtctgc gtaaacagat ggctgttaaa aagtacctga 60

actctatcct gaacgtac 78

<210> 34
<211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0065 : INICIADOR

<400> 34
gttcaggata gagttcaggt actttttaac agccatctgt ttacgcagac gagt 54

<210> 35
<211> 60
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0066 : INICIADOR

<400> 35
ctagaaataa ttttgtttaa ctttaagaag gagatataca tatggcggcc cactctgacg 60

<210> 36
<211> 76
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0067 : INICIADOR

<400> 36

gtagttgtca gtgaaaacag cgtcagagtg ggccgccata tgtatatctc cttcttaaag 60

ttaaacaaaa ttattt 76

<210> 37
<211> 97
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0068 : INICIADOR

<400> 37

tggccgcact ctgacgctgt tttcactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct 60

gttaaaaagt acctgaactc tatcctgaac tgataag 97

<210> 38
<211> 104
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223>P0069 : INICIADOR

<400> 38

ctagcttatc agttcaggat agagttcagg tactttttaa cagccatctg tttacgcaga 60

cgagtgtagt tgtcagtgaa aacagcgtca gagtgcggcc agcc 104

<210> 39
<211> 240
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de fusión pPB1046-mVIP-ELP 1-120

<400> 39

taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt 60

tgtttaactt taagaaggag atatacatat gcactctgac gctgttttca ctgacaacta 120

cactcgtctg cgtaaacaga tggctgttaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc 180

gggcgtgggt gttccgggcg tgggtgttcc gggtggcggt gtgccgggcg caggtgttcc 240

<210> 40
<211> 50
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de fusión mVIP-ELP 1-120

<400> 40

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

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

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

Gly Val
    50
```

<210> 41
<211> 240
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

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

<400> 41

```
taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt      60

tgtttaactt taagaaggag atatacatat ggcggcccac tctgacgctg ttttcactga     120

caactacact cgtctgcgta aacagatggc tgttaaaaag tacctgaact ctatcctgaa     180

cgtaccgggc gtgggtgttc cgggcgtggg tgttccgggt ggcggtgtgc cgggcgcagg     240
```

<210> 42
<211> 49
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de fusión mVIP-ELP 1-120

<400> 42

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

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

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

Ala
```

<210> 43
<211> 180
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de fusión pPB1048 ELP 1-120-VIP

<400> 43

```
tgttccgggt gcaggcgttc cgggtggcgg tgtgccgggc tggccgcact ctgacgctgt      60
tttcactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct gttaaaaagt acctgaactc     120
tatcctgaac tgataagcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgga tccgaattcg     180
```

<210> 44
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia de fusión ELP 1-120-VIP

<400> 44

```
Gly Val Pro Gly Ala Gly Val Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
1               5                   10                  15

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
            20                  25                  30

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
        35                  40
```

<210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N-terminal de VIP modificado

<400> 45

```
Met Ala Ala His Gly
1               5
```

<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> N-terminal de VIP modificado

<400> 46

```
Met Ala Ala His Ser
1               5
```

<210> 47
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Secuencia espaciadora peptídica

<400> 47

```
Gly Phe Leu Gly
1
```

<210> 48
<211> 8135
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> pPB1120

<400> 48

```
taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt      60
tgtttaactt taagaaggag atatacatat ggagaacctg tatttccaac actctgacgc     120
tgttttcact gacaactaca ctcgtctgcg taaacagatg gctgttaaaa agtacctgaa     180
ctctatcctg aacgtaccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt     240
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt     300
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt     360
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt     420
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt     480
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt     540
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt     600
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt     660
```

tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt 720
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 780
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt 840
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt 900
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 960
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt 1020
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1080
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt 1140
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt 1200
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 1260
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt 1320
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1380
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt 1440
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt 1500
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 1560
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt 1620
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1680
tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt 1740
gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt 1800
accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt tccgggtggc ggtgtgccgg gcgtgggtgt 1860
tccgggcgtg ggtgttccgg gtggcggtgt gccgggcgca ggtgttcctg gtgtaggtgt 1920
gccgggtgtt ggtgtgccgg gtgttggtgt accaggtggc ggtgttccgg gtgcaggcgt 1980
tccgggtggc ggtgtgccgg gctggccgtg ataagctagc atgactggtg gacagcaaat 2040
gggtcggatc cgaattcgag ctccgtcgag caccaccacc accaccacca ccactaattg 2100
attaatacct aggctgctaa acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc 2160
tgagcaataa ctagcataac cccttggggc ctctaaacgg gtcttgaggg gttttttgct 2220
gaaaggagga actatatccg gattggcgaa tgggacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc 2280
gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc 2340
gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct 2400
ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa 2460
aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc 2520
cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca 2580
ctcaacccta tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat 2640

tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg 2700
tttacaattt caggtggcac ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt 2760
ttctaaatac attcaaatat gtatccgctc atgaattaat tcttagaaaa actcatcgag 2820
catcaaatga aactgcaatt tattcatatc aggattatca ataccatatt tttgaaaaag 2880
ccgtttctgt aatgaaggag aaaactcacc gaggcagttc cataggatgg caagatcctg 2940
gtatcggtct gcgattccga ctcgtccaac atcaatacaa cctattaatt tcccctcgtc 3000
aaaaataagg ttatcaagtg agaaatcacc atgagtgacg actgaatccg gtgagaatgg 3060
caaaagttta tgcatttctt tccagacttg ttcaacaggc cagccattac gctcgtcatc 3120
aaaatcactc gcatcaacca aaccgttatt cattcgtgat tgcgcctgag cgagacgaaa 3180
tacgcgatcg ctgttaaaag gacaattaca aacaggaatc gaatgcaacc ggcgcaggaa 3240
cactgccagc gcatcaacaa tattttcacc tgaatcagga tattcttcta atacctggaa 3300
tgctgttttc ccggggatcg cagtggtgag taaccatgca tcatcaggag tacggataaa 3360
atgcttgatg gtcggaagag gcataaattc cgtcagccag tttagtctga ccatctcatc 3420
tgtaacatca ttggcaacgc tacctttgcc atgtttcaga aacaactctg gcgcatcggg 3480
cttcccatac aatcgataga ttgtcgcacc tgattgcccg acattatcgc gagcccattt 3540
atacccatat aaatcagcat ccatgttgga atttaatcgc ggcctagagc aagacgtttc 3600
ccgttgaata tggctcataa cacccccttgt attactgttt atgtaagcag acagttttat 3660
tgttcatgac caaaatccct taacgtgagt tttcgttcca ctgagcgtca gaccccgtag 3720
aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa 3780
caaaaaaacc accgctacca gcggtggttt gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt 3840
ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc agataccaaa tactgtcctt ctagtgtagc 3900
cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg tagcaccgcc tacatacctc gctctgctaa 3960
tcctgttacc agtggctgct gccagtggcg ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa 4020
gacgatagtt accggataag gcgcagcggt cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc 4080
ccagcttgga gcgaacgacc tacaccgaac tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa 4140
gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg acaggtatcc ggtaagcggc agggtcggaa 4200
caggagagcg cacgagggag cttccagggg gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg 4260
ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat ttttgtgatg ctcgtcaggg gggcggagcc 4320
tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt tacggttcct ggccttttgc tggccttttg 4380
ctcacatgtt ctttcctgcg ttatcccctg attctgtgga taaccgtatt accgcctttg 4440
agtgagctga taccgctcgc cgcagccgaa cgaccgagcg cagcgagtca gtgagcgagg 4500
aagcggaaga gcgcctgatg cggtattttc tccttacgca tctgtgcggt atttcacacc 4560

gcatatatgg tgcactctca gtacaatctg ctctgatgcc gcatagttaa gccagtatac 4620
actccgctat cgctacgtga ctgggtcatg gctgcgcccc gacacccgcc aacacccgct 4680
gacgcgccct gacgggcttg tctgctcccg gcatccgctt acagacaagc tgtgaccgtc 4740
tccgggagct gcatgtgtca gaggttttca ccgtcatcac cgaaacgcgc gaggcagctg 4800
cggtaaagct catcagcgtg gtcgtgaagc gattcacaga tgtctgcctg ttcatccgcg 4860
tccagctcgt tgagtttctc cagaagcgtt aatgtctggc ttctgataaa gcgggccatg 4920
ttaagggcgg ttttttcctg tttggtcact gatgcctccg tgtaaggggg atttctgttc 4980
atgggggtaa tgataccgat gaaacgagag aggatgctca cgatacgggt tactgatgat 5040
gaacatgccc ggttactgga acgttgtgag ggtaaacaac tggcggtatg gatgcggcgg 5100
gaccagagaa aaatcactca gggtcaatgc cagcgcttcg ttaatacaga tgtaggtgtt 5160
ccacagggta gccagcagca tcctgcgatg cagatccgga acataatggt gcagggcgct 5220
gacttccgcg tttccagact ttacgaaaca cggaaaccga agaccattca tgttgttgct 5280
caggtcgcag acgttttgca gcagcagtcg cttcacgttc gctcgcgtat cggtgattca 5340
ttctgctaac cagtaaggca accccgccag cctagccggg tcctcaacga caggagcacg 5400
atcatgctag tcatgccccg cgcccaccgg aaggagctga ctgggttgaa ggctctcaag 5460
ggcatcggtc gagatcccgg tgcctaatga gtgagctaac ttacattaat tgcgttgcgc 5520
tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 5580
cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgccagggtg gtttttcttt tcaccagtga 5640
gacgggcaac agctgattgc ccttcaccgc ctggccctga gagagttgca gcaagcggtc 5700
cacgctggtt tgccccagca ggcgaaaatc ctgtttgatg gtggttaacg gcgggatata 5760
acatgagctg tcttcggtat cgtcgtatcc cactaccgag atgtccgcac caacgcgcag 5820
cccggactcg gtaatggcgc gcattgcgcc cagcgccatc tgatcgttgg caaccagcat 5880
cgcagtggga acgatgccct cattcagcat ttgcatggtt tgttgaaaac cggacatggc 5940
actccagtcg ccttcccgtt ccgctatcgg ctgaatttga ttgcgagtga gatatttatg 6000
ccagccagcc agacgcagac gcgccgagac agaacttaat gggcccgcta acagcgcgat 6060
ttgctggtga cccaatgcga ccagatgctc cacgcccagt cgcgtaccgt cttcatggga 6120
gaaaataata ctgttgatgg gtgtctggtc agagacatca agaaataacg ccggaacatt 6180
agtgcaggca gcttccacag caatggcatc ctggtcatcc agcggatagt taatgatcag 6240
cccactgacg cgttgcgcga gaagattgtg caccgccgct ttacaggctt cgacgccgct 6300
tcgttctacc atcgacacca ccacgctggc acccagttga tcggcgcgag atttaatcgc 6360
cgcgacaatt tgcgacggcg cgtgcagggc cagactggag gtggcaacgc caatcagcaa 6420
cgactgtttg cccgccagtt gttgtgccac gcggttggga atgtaattca gctccgccat 6480
cgccgcttcc actttttccc gcgttttcgc agaaacgtgg ctggcctggt tcaccacgcg 6540

ggaaacggtc tgataagaga caccggcata ctctgcgaca tcgtataacg ttactggttt 6600
cacattcacc accctgaatt gactctcttc cgggcgctat catgccatac cgcgaaaggt 6660
tttgcgccat tcgatggtgt ccgggatctc gacgctctcc cttatgcgac tcctgcatta 6720
ggaagcagcc cagtagtagg ttgaggccgt tgagcaccgc cgccgcaagg aatggtgcat 6780
gcaaggagat ggcgcccaac agtcccccgg ccacggggcc tgccaccata cccacgccga 6840
aacaagcgct catgagcccg aagtggcgag cccgatcttc cccatcggtg atgtcggcga 6900
tataggcgcc agcaaccgca cctgtggcgc cggtgatgcc ggccacgatg cgtccggcgt 6960
agaggatcga gatcttgtac atccctatca gtgatagaga ttgacatccc tatcagtgat 7020
agagatactg agcacatcag caggacgcac tgaccgattt cattaaagag gagaaaggta 7080
ccatgggaga aagcttgttt aagggaccac gtgattacaa cccgatatcg agcaccattt 7140
gtcatttgac gaatgaatct gatgggcaca caacatcgtt gtatggtatt ggatttggtc 7200
ccttcatcat tacaaacaag cacttgttta gaagaaataa tggaacactg ttggtccaat 7260
cactacatgg tgtattcaag gtcaagaaca ccacgacttt gcaacaacac ctcattgatg 7320
ggagggacat gataattatt cgcatgccta aggatttccc accatttcct caaaagctga 7380
aatttagaga gccacaaagg gaagagcgca tatgtcttgt gacaaccaac ttccaaacta 7440
agagcatgtc tagcatggtg tcagacacta gttgcacatt cccttcatct gatggcatat 7500
tctggaagca ttggattcaa accaaggatg ggcagtgtgg cagtccatta gtatcaacta 7560
gagatgggtt cattgttggt atacactcag catcgaattt caccaacaca aacaattatt 7620
tcacaagcgt gccgaaaaac ttcatggaat tgttgacaaa tcaggaggcg cagcagtggg 7680
ttagtggttg gcgattaaat gctgactcag tattgtgggg gggccataaa gttttcatgg 7740
tgaaacctga agagcctttt cagccagtta aggaagcgac tcaactcatg aatgaattgg 7800
tgtactcgca atgataggga tccggctgct aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct 7860
gctgccaccg ctgagcaata actagcataa ccccttgggg cctctaaacg ggtcttgagg 7920
ggttttttgc tgaaaggagg aactatatcc ggatatcccg caagaggccc ggcagtaccg 7980
gcataaccaa gcctatgcct acagcatcca gggtgacggt gccgaggatg acgatgagcg 8040
cattgttaga tttcatacac ggtgcctgac tgcgttagca atttaactgt gataaactac 8100
cgcattaaag cttatcgatc tcgatcccgc gaaat 8135

<210> 49
<211> 1905
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VIP ELP1-120

<400> 49

```
cactctgacg ctgttttcac tgacaactac actcgtctgc gtaaacagat ggctgttaaa      60
aagtacctga actctatcct gaacgtaccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg     120
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg     180
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg     240
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct     300
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg     360
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg     420
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg     480
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg     540
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct     600
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg     660
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg     720
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg     780
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg     840
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct     900
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg     960
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg    1020
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg    1080
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg    1140
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct    1200
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg    1260
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg    1320
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg    1380
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg    1440
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct    1500
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg    1560
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg    1620
ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg    1680
ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg    1740
ggcgtgggtg ttccgggcgt gggtgttccg ggtggcggtg tgccgggcgc aggtgttcct    1800
ggtgtaggtg tgccgggtgt tggtgtgccg ggtgttggtg taccaggtgg cggtgttccg    1860
ggtgcaggcg ttccgggtgg cggtgtgccg ggctggccgt gataa                    1905
```

<210> 50
<211> 633
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> VIP ELP1-120
<400> 50

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Gly Gly Val Pro Gly Trp Pro
625 630

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica que comprende un péptido VIP que comprende (i) la secuencia de aminoácidos de la sec. con núm. de ident.: 13 con la His N-terminal en la posición 2, y (ii) una metionina N-terminal que aumenta la preferencia del péptido VIP para VPAC2 frente a VPAC1 y que tiene un péptido similar a la elastina (ELP) en el extremo C-terminal prolongando la fase de absorción desde un sitio de inyección y extendiendo la vida media circulatoria, el ELP que tiene de 75 a 130 unidades de VPGXG (sec. con núm. de ident.:3) donde la composición de X es Val, Ala y Gly en una relación de 5:2:3.

2. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, en donde el péptido VIP tiene una preferencia de unión relativa para VPAC2 sobre VPAC1 de al menos 2:1 o al menos 50:1.

3. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la composición se formula para la administración parenteral.

4. La composición de conformidad con la reivindicación 3, en donde la composición se formula para la administración subcutánea, intramuscular o intravenosa.

5. La composición de conformidad con la reivindicación 3 o la reivindicación 4 para su uso en un método para tratar la hipertensión, insuficiencia cardíaca, fibrosis miocárdica o reducir las respuestas inflamatorias en un sujeto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición.

6. La composición para su uso en el tratamiento de la hipertensión de conformidad con la reivindicación 5, en donde el sujeto tiene hipertensión seleccionada de hipertensión pulmonar, hipertensión esencial no controlada e hipertensión resistente.

7. La composición para su uso en el tratamiento de respuestas inflamatorias de conformidad con la reivindicación 5, en donde el sujeto tiene una respuesta inflamatoria seleccionada de respuestas de hipersensibilidad de tipo retardado, desarrollo de células T autorreactivas y una afección definida por inflamación de tipo TH1 o autoinmunidad TH1.

8. La composición para su uso de conformidad con la reivindicación 7, en donde el sujeto tiene una afección definida por inflamación del tipo TH1 o autoinmunidad TH1 seleccionada de artritis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, diabetes tipo 1, esclerosis múltiple, rechazo de trasplantes, síndrome de Sjogren, pancreatitis, uveoretinitis, queratitis y choque séptico.

9. La composición para su uso de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 8, en donde en el método la composición se administra de una a tres veces por semana, o se administra diariamente.

10. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 3 o la reivindicación 4 para su uso como un medicamento.

Figura 1

sec. con núm. de ident.: 14

M-VIP ELP1-120 **(M añadido al extremo N-terminal de VIP)**

MHSDAVFTDNYTRLRKOMAVKKYLNSILN
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGWP **(sec.con núm. de ident.: 14)**

ELP1-120 = $(VPGXG)_{120}$ donde X = $V_5G_3A_2$

Figura 2

sec. con núm. de ident.: 15

MAA-VIP ELP1-120 **(antes del procesamiento, MAA añadido al extremo N-terminal de VIP)**

MAAHSDAVFTDNYTRLRKOMAVKKYLNSILN
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGVG VPGVG VPGVG VPGGG VPGAG VPGGG
VPGWP **(sec.con núm. de ident.:15)**

ELP1-120 = $(VPGXG)_{120}$ donde X = $V_5G_3A_2$

Figura 3

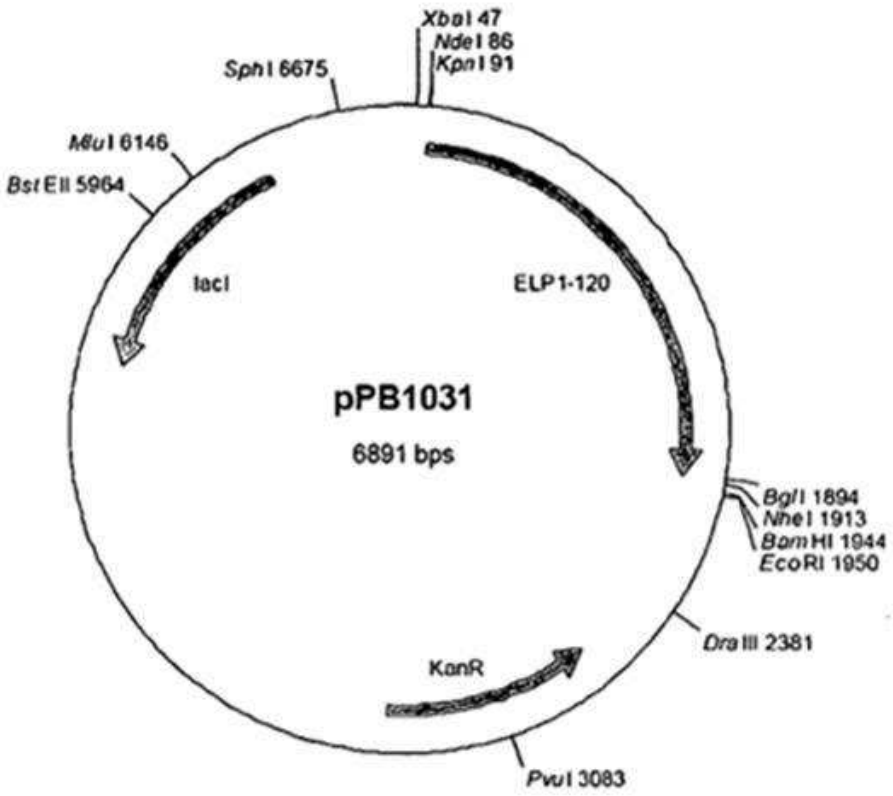
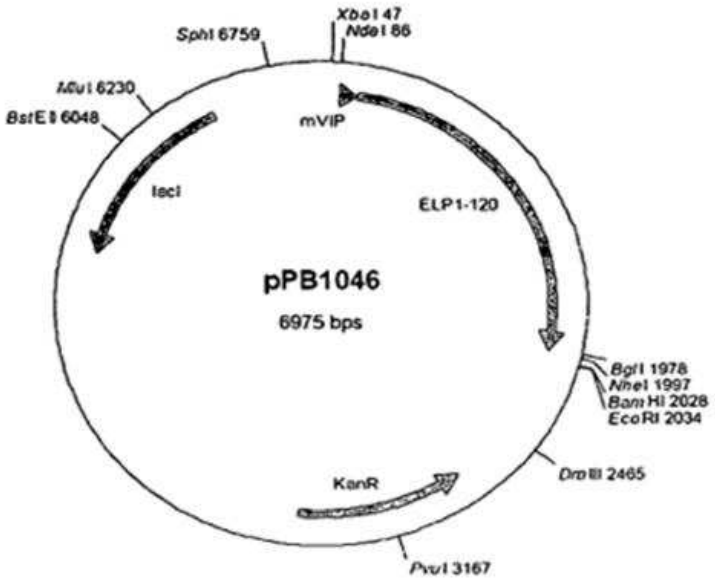

XbaI 47
NdeI 86
KpnI 91
SphI 6675
MluI 6146
BstEII 5964
lacI
ELP1-120
pPB1031
6891 bps
BglI 1894
NheI 1913
BamHI 1944
EcoRI 1950
DraIII 2381
KanR
PvuI 3083

Figura 4



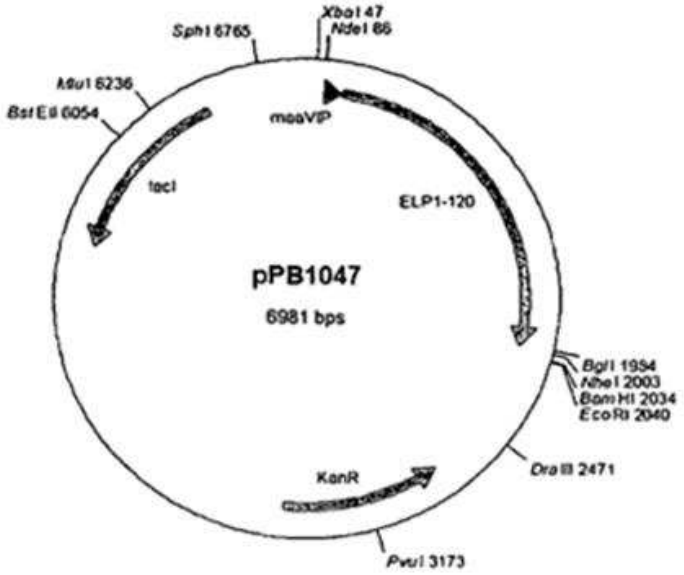

```
                                                        XbaI
                                                      --+-----
                                                          P0045
                                                   aattCTCTA GAAATAATTT
  1  taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt
     attatgctga gtgatatccc cttaacattc gcctattgtt aaggggagat ctttattaaa
                                                        GAGAT CTTTATTAAA
                                                        <-P0048

                                 NdeI
                              --+----
                                                          P0064
                                                   CTGTTTTCA CTGACAACTA
                         P0045 >
     TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GCACTCTGAC G
 61  tgtttaactt taagaaggag atatacatat gcactctgac gctgttttca ctgacaacta
     acaaattgaa attcttcctc tatatgtata cgtgagactg cgacaaaagt gactgttgat
     ACAAATTGAA ATTCTTCCTC TATATGTATA CGTGAGACTG CGACAAAAGT GACTGTTGAT
                                 P0048
                                 >>.............mVIP...............>
                                    m  h  s  d   a  v  f   t  d  n

                                 P0064 >
     CACTCGTCTG CGTAAACAGA TGGCTGTTAA AAAGTACCTG AACTCTATCC TGAACGTAC
121  cactcgtctg cgtaaacaga tggctgctaa aaagtacctg aactctatcc tgaacgtacc
     gtgagcagac gcatttgtct accgacaatt tttcatggac ttgagatagg acttgcatgg
     G
P0048
      TGAGCAGAC GCATTTGTCT ACCGACAATT TTTCATGGAC TTGAGATAGG ACTTG
                                 <-P0065
     >...........................mVIP.......................>>>>..
     y  t  r  l   r  k  q   m  a  v   k  k  y  l   n  s  i   l  n  v

181  gggcgtgggt gttccgggcg tgggtgttcc gggtggcggt gtgcccgggcg caggtgttcc
     cccgcaccca caaggcccgc acccacaagg cccaccgcca cacggcccgc gtccacaagg
     >>..........................ELP1-120.........................>
     p  g  v  g   v  p  g   v  g  v   p  g  g  g   v  p  g   a  g  v
```

Figura 5



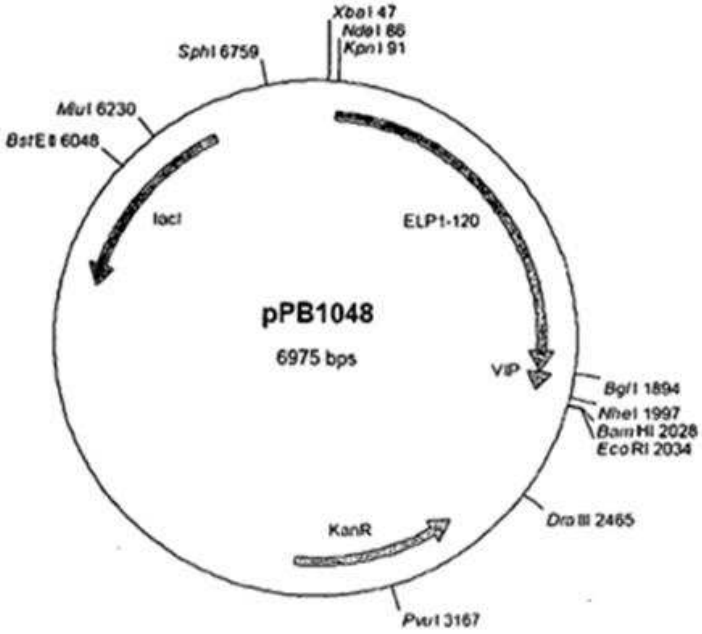

```
                                                        --+-----
                                                                P0066
                                                          CTA GAAATAATTT
  1  taatacgact cactataggg gaattgtgag cggataacaa ttcccctcta gaaataattt
     attatgctga gtgatatccc cttaacactc gcctattgtt aaggggagat ctttattaaa
                                                                TTTATTAAA
                                                                P0067

                                 NdeI
                               --+----
                                                                P0064
                                                          CTG TTTTCACTGA
                            P0066 >
     TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GGCGGCCCAC TCTGACG
 61  tgtttaactt taagaaggag atatacatat ggcggcccac tctgacgctg ttttcactga
     acaaattgaa attcttcctc tatatgtata ccgccgggtg agactgcgac aaaagtgact
     ACAAATTGAA ATTCTTCCTC TATATGTATA CCGCCGGGTG AGACTGCGAC AAAAGTGACT
                                P0067
                                >>.............mVIP...............>
                                   m  a  a  h   s  d  a   v  f  t

                                P0064
     CAACTACACT CGTCTGCGTA AACAGATGGC TGTTAAAAAG TACCTGAACT CTATCCTGAA
121  caactacact cgtctgcgta aacagatgggc tgttaaaaag tacctgaact ctatcctgaa
     gttgatgtga gcagacgcat ttgtctaccg acaatttttc atggacttga gataggactt
     GTTGATG
      P0067
          TGA GCAGACGCAT TTGTCTACCG ACAATTTTTC ATGGACTTGA GATAGGACTT
                                < P0065
     >...............................mVIP................................>
     d  n  y  t   r  l  r   k  q  m   a  v  k  k   y  l  n   s  i  l

   P0065
     G
    P0064 >
     CGTAC
181  cgtaccgggc gtgggtgtcc cgggcgtggg tgttccgggt ggcggtgtgc cgggcgcagg
     gcatggcccg cacccacaag gcccgcaccc acaaggccca ccgccacacg gcccgcgtcc
     > mVIP
     n
      >>...........................ELP1-120..........................>
        v  p  g   v  g  v   p  g  v   g  v  p  g   g  g  v   p  g  a
```

Figura 6



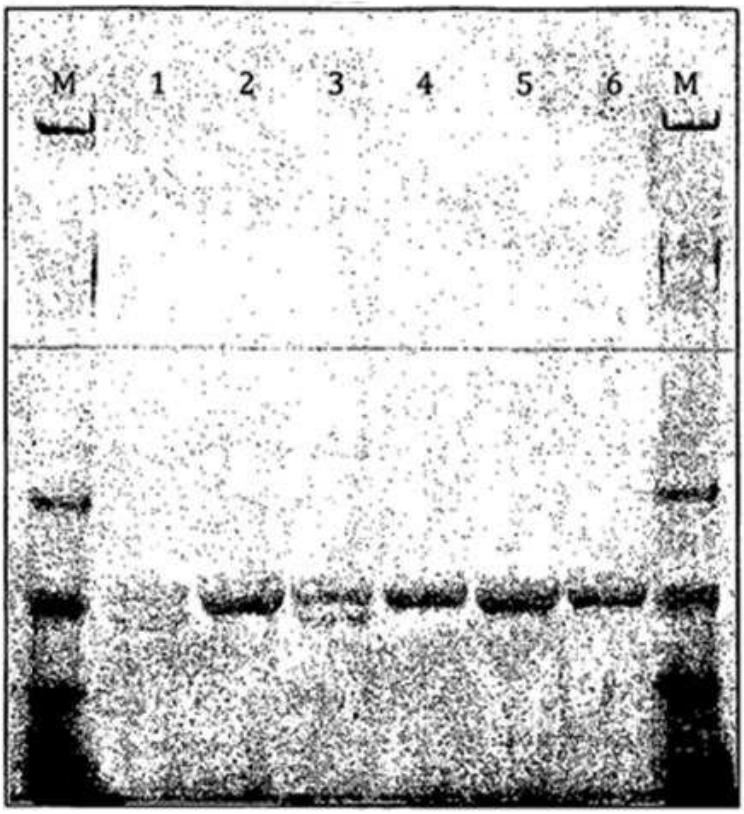

```
                                                  BglI
                                              -------+----
                                                                  P0068
                                                          TGGCCGCACT CTGACGCTGT
1861  tgttccgggt gcaggcgttc cgggtggcgg tgtgccgggc tggccgcact ctgacgctgt
      acaaggccca cgtccgcaag gcccaccgcc acacggcccg accggcgtga gactgcgaca
                                                        CCGGACCGGCGTGA GACTGCGACA
                                                                  P0069
      >....................ELP1-120...................>>
      g  v  p  g   a  g  v   p  g  g   g  v  p  g   w  p
                                                              >>....VIP.....>
                                                                h   s  d  a

                                      P0068
      TTTCACTGAC AACTACACTC GTCTGCGTAA ACAGATGGCT GTTAAAAAGT ACCTGAACTC
1921  tttcactgac aactacactc gtctgcgtaa acagatggct gttaaaaagt acctgaactc
      aaagtgactg ttgatgtgag cagacgcatt tgtctaccga caatttttca tggacttgag
      AAAGTGACTG TTGATGTGAG CAGACGCATT TGTCTACCGA CAATTTTTCA TGGACTTGAG
                                      P0069
      >...............................VIP...............................>
      v  f  t  d   n  y  t   r  l  r   k  q  m  a   v  k  k   y  l  n

                                                                    EcoRI
                                                                   -+----
                          NheI                                BamHI
                        -+-----                              -+-----
            P0068 >
      TATCCTGAAC TGATAAG
1981  tatcctgaac tgataagcta gcatgactgg tggacagcaa atgggtcgga tccgaattcg
      ataggacttg actattcgat cgtactgacc accgtcgctt tacccagcct aggcttaagc
      ATAGGACTTG ACTATTCGAT C
            P0069
      >......VIP.....>>
      s  i  l  n   -  -
```

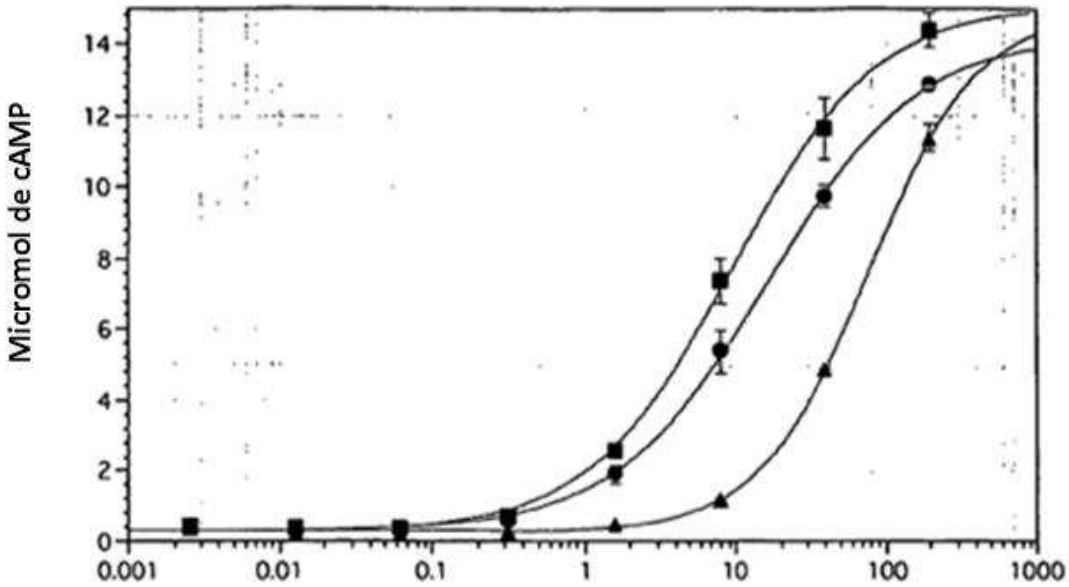
Figura 7

NuPAGE Tris-Acetato al 10%



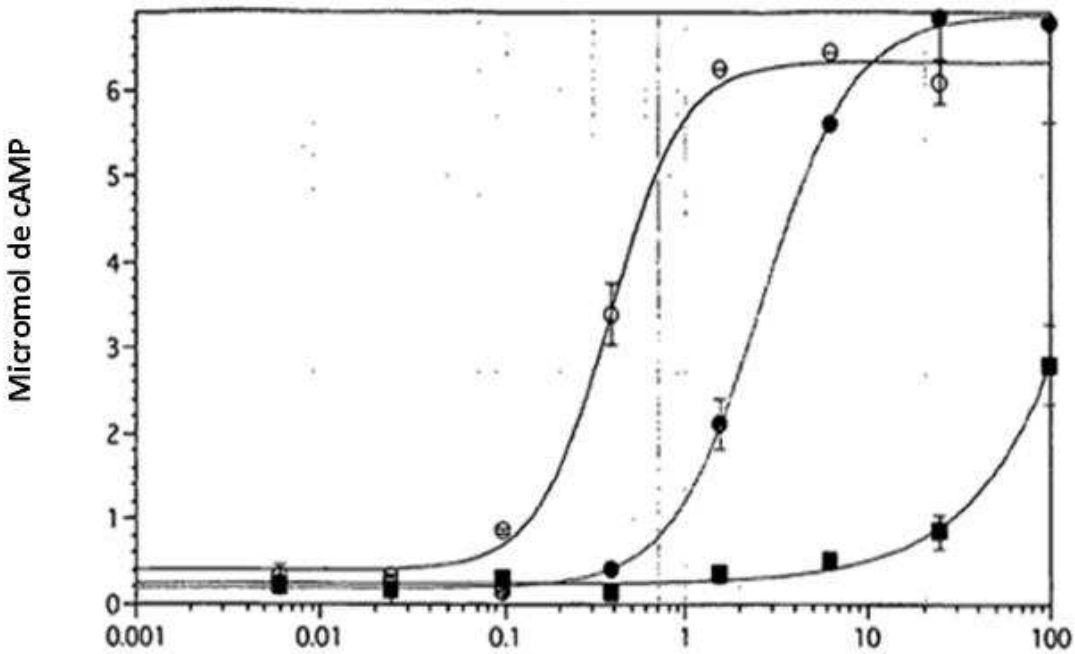
M. Marcadores de Peso Mol.
1. PB1046
2. PB1046 Calentado*
3. PB1047
4. PB1047 Calentado*
5. PB1048
6. PB1048 Calentado*
M. Marcadores de Peso Mol.

Figura 8



Ajuste 4-P: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:	A	B	C	D	R^2
● VIP-Péptido (VIP2: concentración vs Resultado medio	0.269	0.859	16.2	14.3	0.999
■ PB1046 (A2: concentración vs Resultado medio)	0.248	0.909	9.53	15.1	0.999
▲ PB1047 (C2: concentración vs Resultado medio)	0.237	1.19	77.3	15	1

Figura 9



Ajuste 4-P: y = (A - D)/(1 + (x/C)^B) + D:	A	B	C	D	R^2
● PB1047 (B: concentración vs Resultado medio)	0.182	1.73	2.66	6.87	1
■ PB1046 (C: concentración vs Resultado medio)	0.224	0.96	1.88e+08	2.72e+06	0.993
○ Péptido VIP (VIP: concentración vs Resultado medio)	0.386	2.15	0.379	6.32	0.997

Figura 10

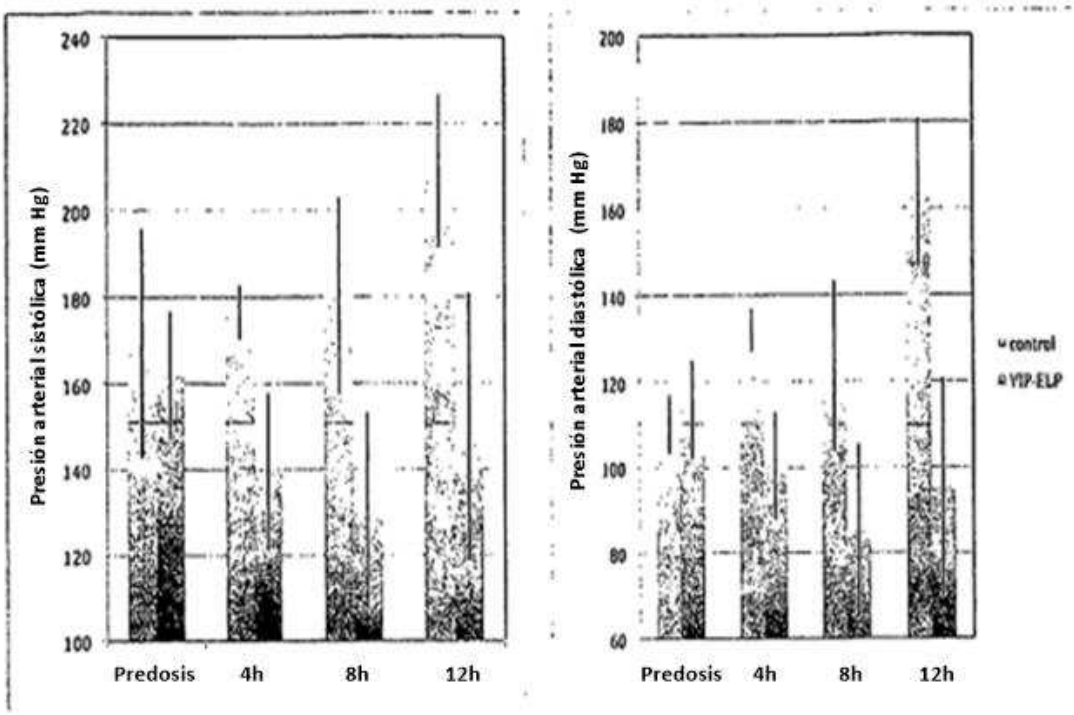

Presión arterial sistólica (mm Hg)
240
220
200
180
160
140
120
100
Predosis
4h
8h
12h
Presión arterial diastólica (mm Hg)
200
180
160
140
120
100
80
60
Predosis
4h
8h
12h
control
YIP-ELP

Figura 11

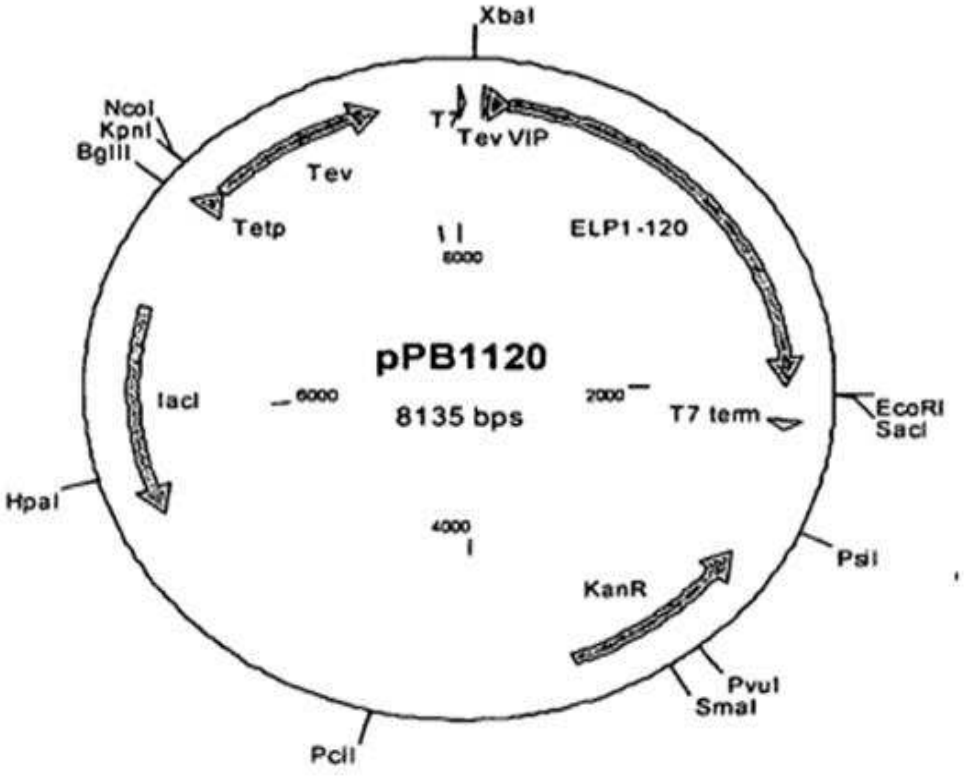

XbaI
NcoI
KpnI
BglII
T7
Tev VIP
Tev
Tetp
ELP1-120
8000
pPB1120
8135 bps
lacI
6000
2000
T7 term
EcoRI
SacI
HpaI
4000
PstI
KanR
PvuI
SmaI
PciI

Figura 12

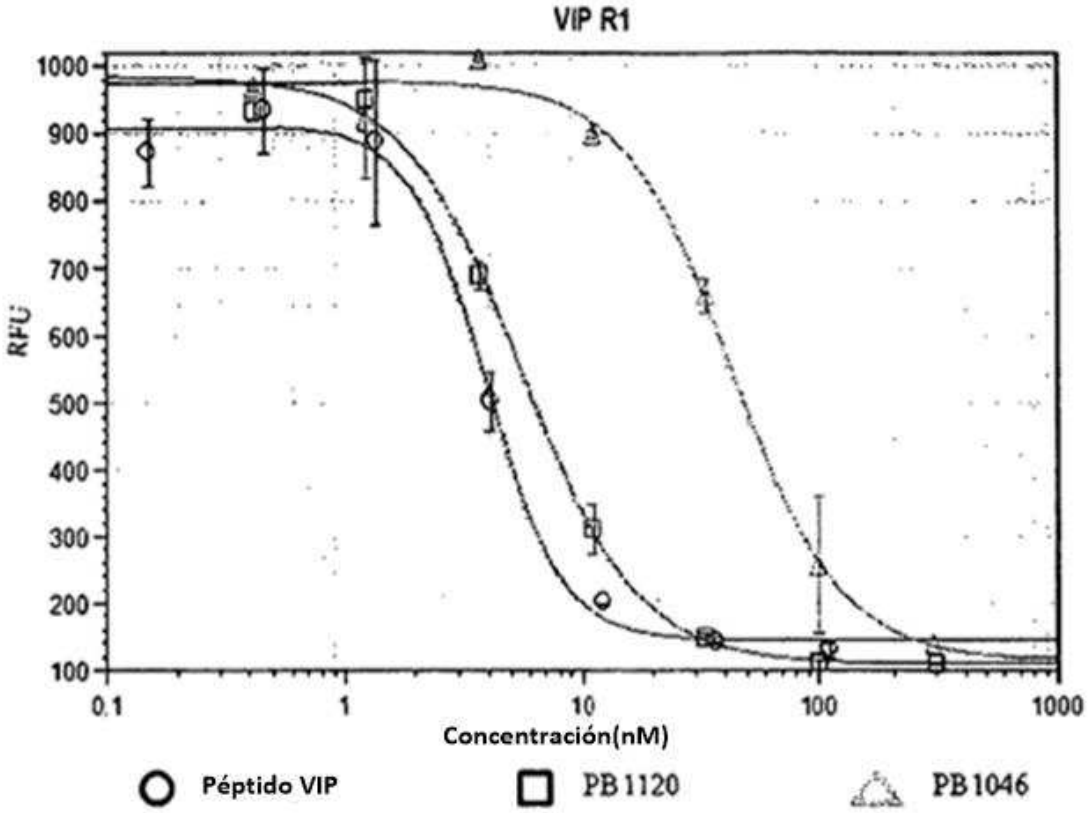

VIP R1
RFU
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0.1
1
10
100
1000
Concentración(nM)
Péptido VIP
PB 1120
PB 1046

Figura 13

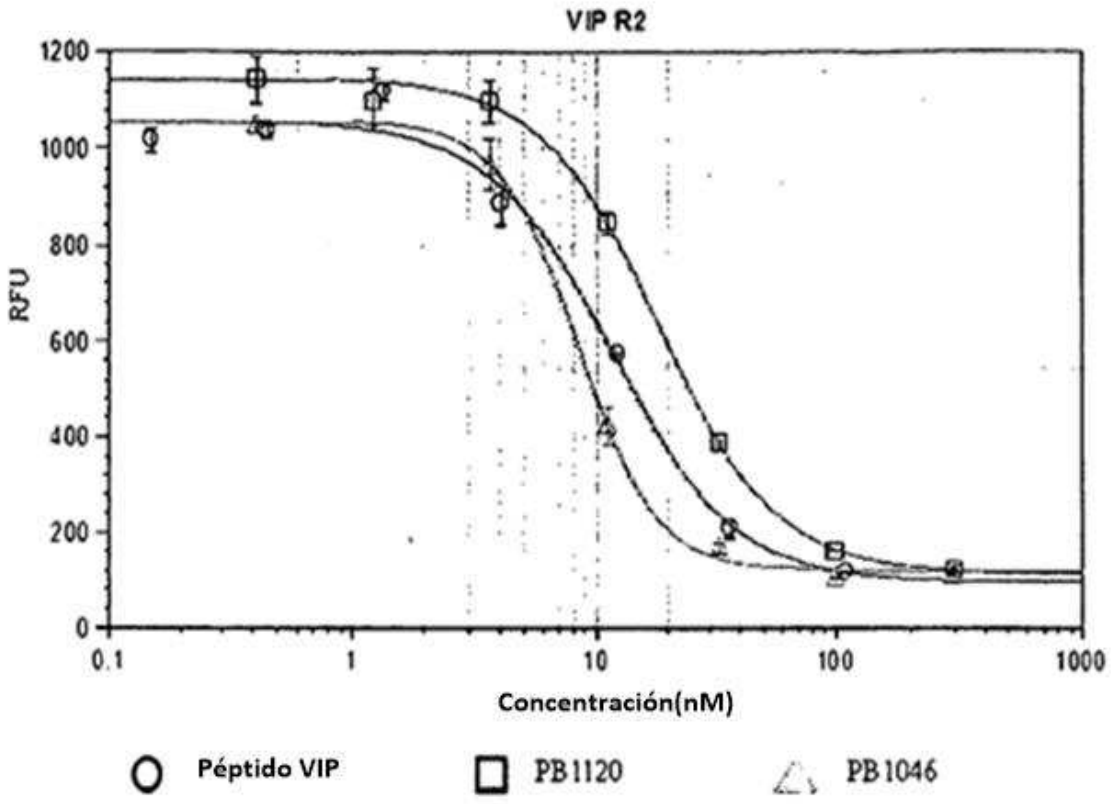
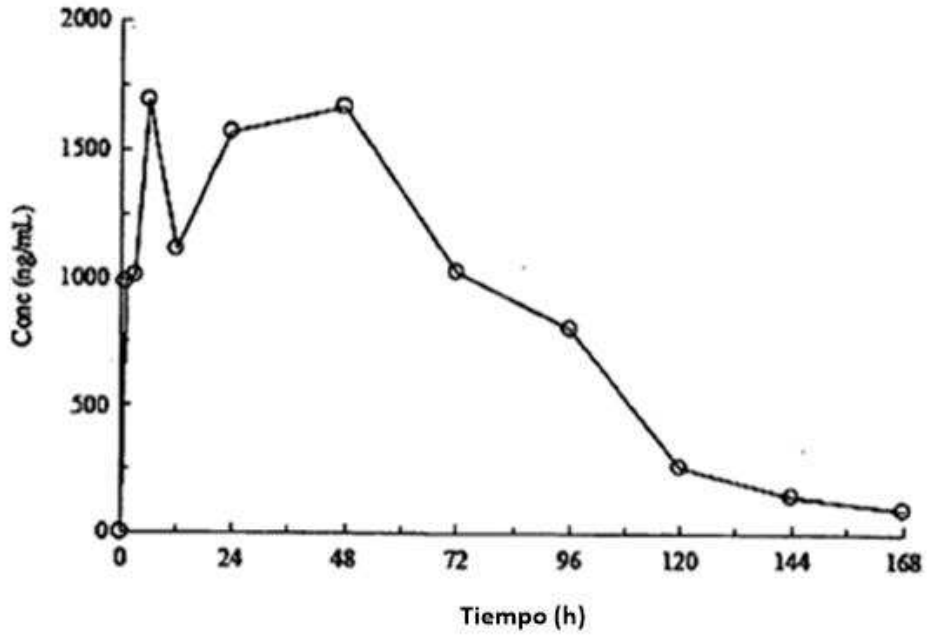

VIP R2
1200
1000
800
600
400
200
0
RFU
0.1
1
10
100
1000
Concentración(nM)
Péptido VIP
PB1120
PB1046

Figura 14

A


2000
1500
1000
500
0
Conc (ng/mL)
0
24
48
72
96
120
144
168
Tiempo (h)

B

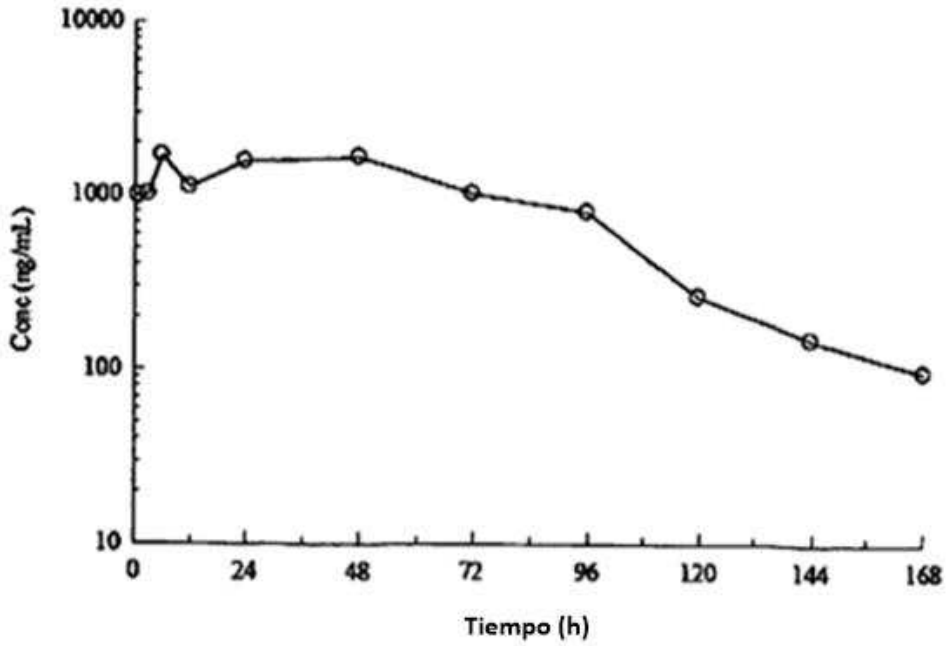

10000
1000
100
10
Conc (ng/mL)
0
24
48
72
96
120
144
168
Tiempo (h)

Figura 15A

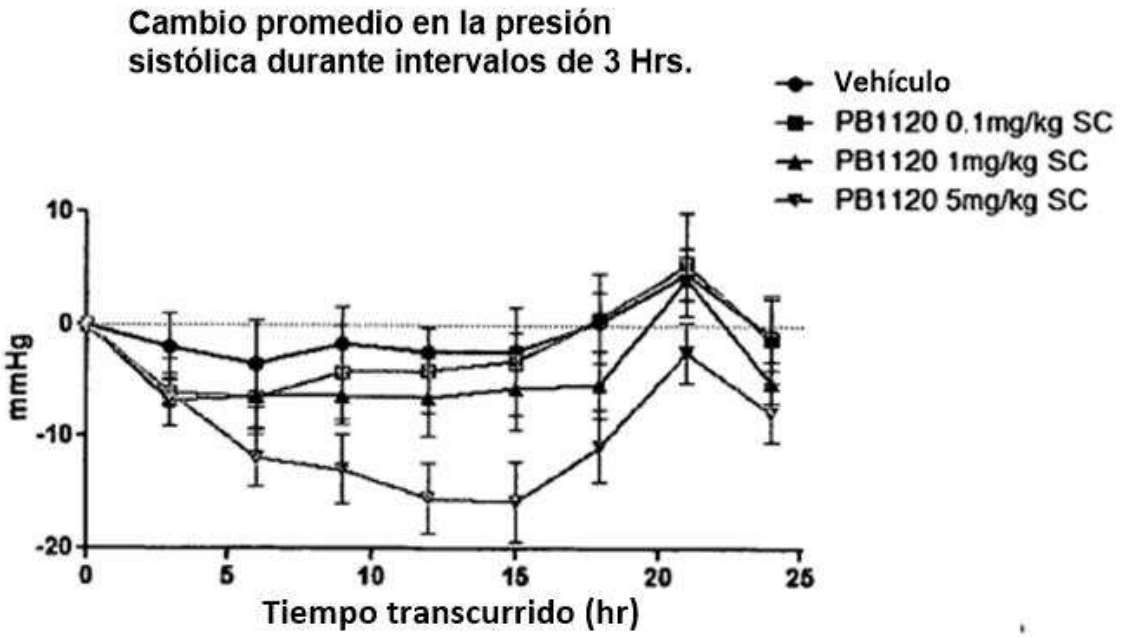

Cambio promedio en la presión sistólica durante intervalos de 3 Hrs.
Vehículo
PB1120 0.1mg/kg SC
PB1120 1mg/kg SC
PB1120 5mg/kg SC
mmHg
10
0
-10
-20
0
5
10
15
20
25
Tiempo transcurrido (hr)

Figura 15B

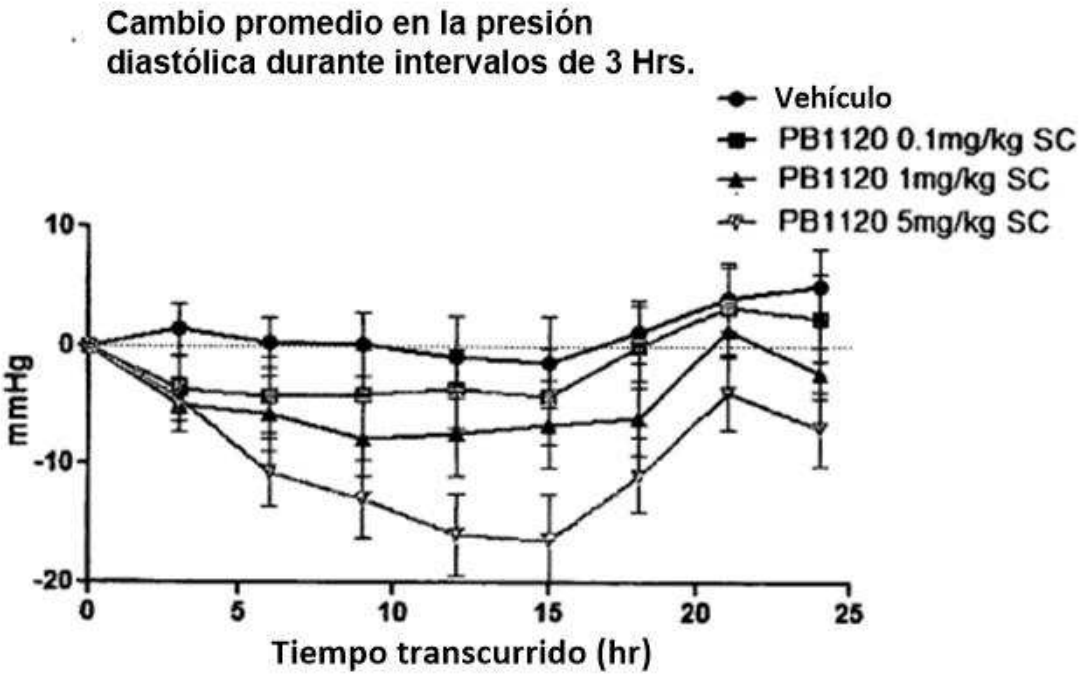

Cambio promedio en la presión diastólica durante intervalos de 3 Hrs.
Vehículo
PB1120 0.1mg/kg SC
PB1120 1mg/kg SC
PB1120 5mg/kg SC
10
0
-10
-20
mmHg
0
5
10
15
20
25
Tiempo transcurrido (hr)

Figura 15C

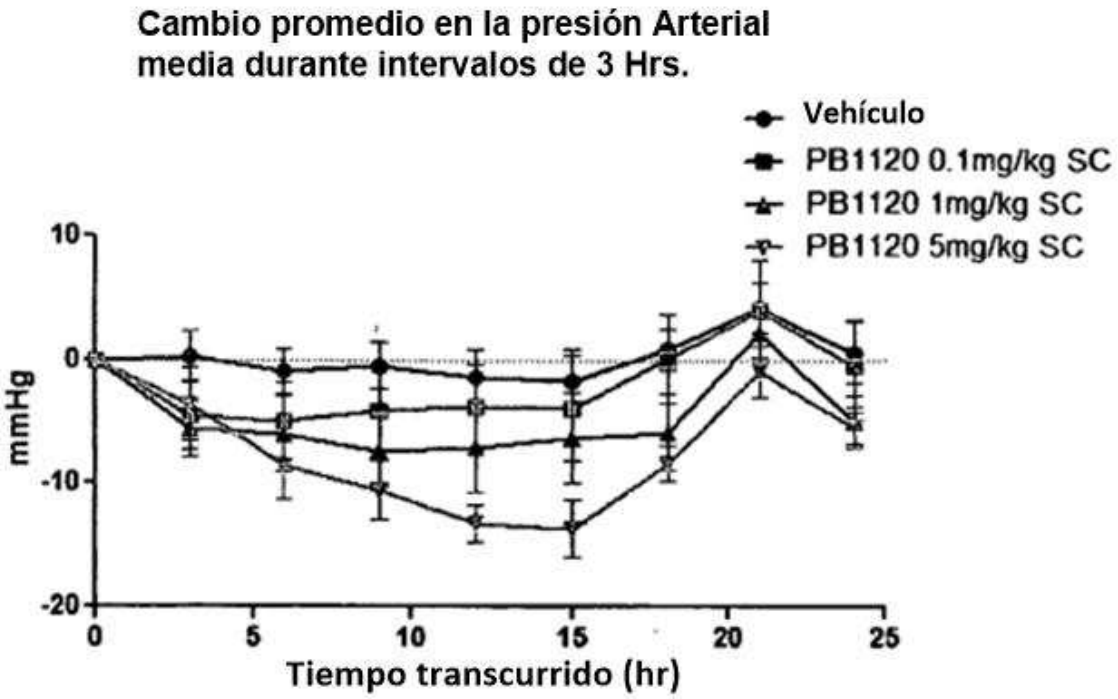
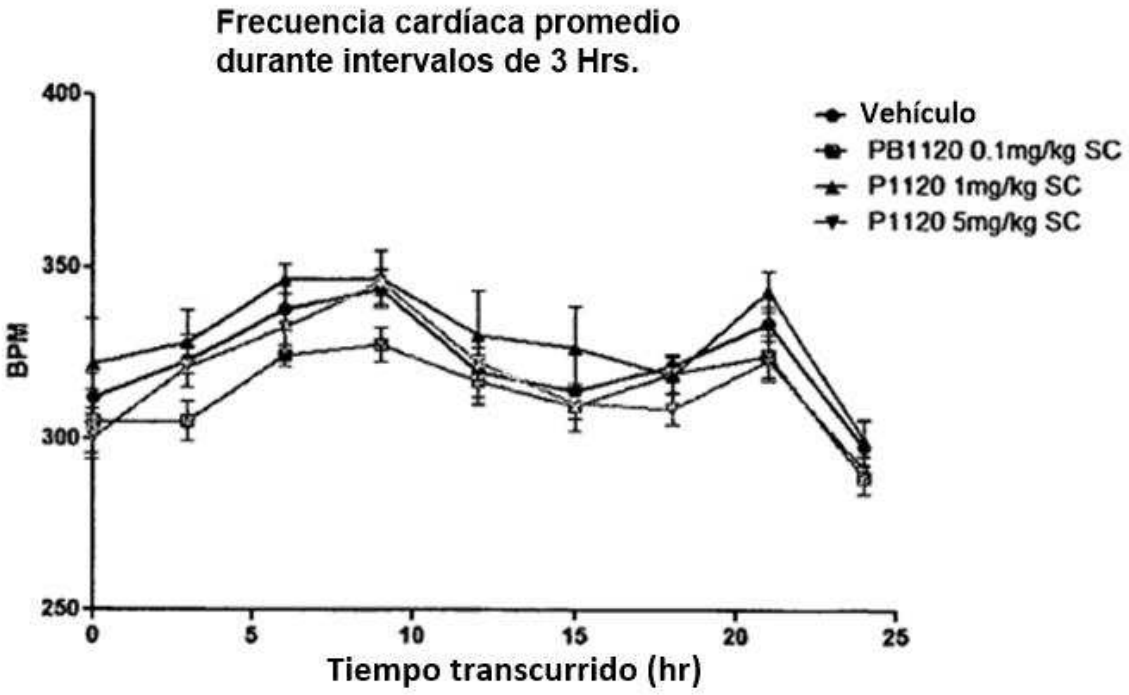

Cambio promedio en la presión Arterial media durante intervalos de 3 Hrs.
Vehículo
PB1120 0.1mg/kg SC
PB1120 1mg/kg SC
PB1120 5mg/kg SC
mmHg
10
0
-10
-20
0
5
10
15
20
25
Tiempo transcurrido (hr)

Figura 15D


Frecuencia cardíaca promedio
durante intervalos de 3 Hrs.
Vehículo
PB1120 0.1mg/kg SC
P1120 1mg/kg SC
P1120 5mg/kg SC
BPM
400
350
300
250
0
5
10
15
20
25
Tiempo transcurrido (hr)