

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 343**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/10** (2006.01)

**A61K 38/08** (2006.01)

**A61K 38/20** (2006.01)

**A61P 11/06** (2006.01)

**A61P 35/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/US2012/042118**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12174028**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12800251 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2717897**

54 Título: **Composiciones de péptidos y métodos para tratar lesión pulmonar, asma, anafilaxis, angioedema, síndromes de permeabilidad vascular sistémica y congestión nasal**

30 Prioridad:

**13.06.2011 US 201161496409 P**

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

**20.09.2017**

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF ILLIONIS (100.0%)  
352 Henry Administration Building, 506 South Wright Street  
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

**KOMAROVA, YULIA A.;  
SAQIB, UZMA;  
VOGEL, STEPHEN M. y  
MALIK, ASRAR B.**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 633 343 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

Composiciones de péptidos y métodos para tratar lesión pulmonar, asma, anafilaxis, angioedema, síndromes de permeabilidad vascular sistémica y congestión nasal

5

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a péptidos para tratar lesiones pulmonares, incluyendo extravasaciones vasculares mediadas por inflamación y el desarrollo de edema. La presente invención también se refiere al tratamiento de asma, anafilaxis, angioedema, síndromes de permeabilidad vascular sistémica y congestión nasal, usando los péptidos.

10

**Antecedentes**

El citoesqueleto de microtúbulos (MT) proporciona un punto de control importante de la regulación de la barrera endotelial; sin embargo, no se ha estudiado bien el papel de este elemento clave del citoesqueleto. Se ha demostrado que el fármaco taxol, que estabiliza a los MT, atenúa la lesión pulmonar en modelos de ratón, lo que sugiere que los MT pueden ser importantes para mediar el aumento de la permeabilidad vascular del pulmón. Sin embargo, el taxol presenta una toxicidad general que hace que sea un fármaco poco conveniente desde el punto de vista de los médicos y de sus pacientes.

20

Las proteínas que se unen a los extremos de los microtúbulos son factores accesorios de localización del extremo + de los microtúbulos, altamente conservados, que se unen a los microtúbulos (MT) en crecimiento y suprimen acontecimientos catastróficos de los MT. Dos de estas proteínas de unión a los extremos, EB1 y EB3, intervienen en la regulación de la dinámica del citoesqueleto endotelial y del cambio de forma de las células, los determinantes principales de la permeabilidad de la barrera endotelial.

25

El  $Ca^{2+}$  es un segundo mensajero muy versátil que regula la permeabilidad endotelial y la homeostasis vascular. La activación de la fosfolipasa C  $\beta$  (PLCP), aguas abajo de la activación de PAR-1, media la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) en inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 estimula la liberación de  $Ca^{2+}$  desde depósitos intracelulares sensibles a IP3, es decir, desde el retículo endoplásmico (RE). El agotamiento de  $Ca^{2+}$  de los depósitos del RE está mediado por la activación de IP3R en la membrana del RE y conduce a un aumento transitorio en el  $Ca^{2+}$  intracelular. La entrada o "influjo" de  $Ca^{2+}$  está mediada por canales canónicos receptores de potencial transitorio (TRPC) que son permeables a diversos cationes entre los que se incluyen  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$ . TRPC1 y 4 son canales de  $Ca^{2+}$  accionados por depósito (SOC) en las células microvasculares endoteliales del pulmón que se activan por agotamiento del RE.

30

35

El aumento de la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  regula positivamente la actividad de la proteína quinasa C $\alpha$  (PKC  $\alpha$ ). PKC  $\alpha$  es un regulador clave de la respuesta de permeabilidad endotelial a múltiples mediadores [2].

40

PKC  $\alpha$  fosforila la p120-catenina y media su disociación de la cadherina VE, dando esto como resultado la internalización de la cadherina VE. PKC  $\alpha$  también actúa aguas arriba de la activación de RhoA por la fosforilación de p115RhoGEF y GDI-1. RhoA, a su vez, facilita la inhibición, inducida por fosforilación, de la fosfatasa de la cadena ligera de miosina (MLCP) activando la Rho quinasa (ROCK). La inhibición de MLCP va acompañada de la activación dependiente de  $Ca^{2+}$ /calmodulina de MLCK que conduce a la fosforilación de MLC e induce la contracción de acto-miosina en respuesta a mediadores proinflamatorios tales como trombina e histamina.

45

La integridad del citoesqueleto de MT es necesaria para la liberación de  $Ca^{2+}$  inducida por IP3 desde los depósitos del RE. La alteración de la dinámica de los MT mediante los agentes desestabilizadores de MT o estabilizadores de MT nocodazol, colchicina y taxol inhibe la liberación de  $Ca^{2+}$  activada por IP3, lo que sugiere que se requiere la dinámica de los MT para una activación completa de IP3R. El citoesqueleto de MT está implicado en la remodelación del RE, asegurándose de esta manera la organización y propagación de ondas de  $Ca^{2+}$  en respuesta a estímulos externos. El RE se une y se alarga junto con los extremos en crecimiento de los MT mediante interacción directa de EB1 y EB3 con la molécula de interacción estromal 1 (STIM1). El agotamiento de EB1 en HeLa (las células HeLa no expresan EB3) reduce los acontecimientos de protrusión del RE, aunque no inhibe la activación de SOC por taspigargina, lo que sugiere que están implicados otros mecanismos en la activación de SOC y la propagación de la señalización de calcio en las células epiteliales. En las células endoteliales, la localización de IP3R en caveolas es crítica tanto para el agotamiento de los depósitos de  $Ca^{2+}$  del RE como para la activación de SOC. Esto indica que la activación de IP3R y/o su capacidad de respuesta a IP3 es un elemento importante de la señalización del calcio. Se propone que el citoesqueleto de MT regula positivamente la activación de IP3R en respuesta a IP3 y, por lo tanto, transmite señales extracelulares a través de toda la célula, induciendo una respuesta fisiológica. Se desvela un fragmento de la secuencia de proteína del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato de tipo 3 y se puede recuperar en el n.º de registro de EBI de UNIPROT: A6H8K3. La secuencia proteica de un sistema de liberación de lipoproteínas de la familia LolC/E, una proteína transmembrana, se desvela y es recuperable con el n.º de registro de EBI de UNIPROT: F2AQ33.

50

55

60

65

A pesar de la avanzada asistencia médica en los Estados Unidos, aproximadamente 100.000 pacientes mueren al año por lesión pulmonar aguda (ALI), una respuesta inflamatoria compleja asociada con la infiltración de neutrófilos y la liberación de citocinas y mediadores proinflamatorios durante la septicemia. La hiperpermeabilidad de los vasos pulmonares, una característica típica de la enfermedad, lleva a la formación de edema pulmonar. Se necesitan nuevas terapias para prevenir o tratar la disfunción de la barrera endotelial.

### Sumario de la invención

En el presente documento se desvela un péptido aislado. El péptido puede comprender KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), un fragmento del mismo o una variante del mismo. Un primer aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), un fragmento de la misma, en donde el fragmento reduce la Interacción entre la Proteína 3 de unión al Extremo (EB3) y el Receptor de Inositol 1,4,5-trisfosfato de Tipo 3 (IP3R3). El péptido también puede consistir en una variante del mismo. La variante puede comprender una sustitución conservativa. La variante puede comprender cualquier secuencia peptídica que contenga la secuencia Ser/Thr-x-Ile-Pro, la secuencia del motivo consenso de unión a EB mínima. El péptido puede estar miristoilado o puede estar unido a un péptido transportador. El péptido transportador puede ser el péptido antennapedia (AP). El péptido puede formar parte de una formulación farmacéutica, que puede incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), o un fragmento de la misma para uso en el tratamiento de la lesión pulmonar, síndromes de permeabilidad vascular sistémica, angioedema, anafilaxis o congestión nasal asociada con rinitis alérgica o no alérgica, en donde el péptido reduce la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. La lesión pulmonar puede ser una extravasación vascular mediada por inflamación, o asma, que puede ser asma alérgica. El asma alérgica puede ser crónica o aguda.

En una realización, los síndromes de permeabilidad vascular sistémica pueden deberse a endotoxemia, traumatismo o transfusiones múltiples. Los síndromes también pueden producirse como un efecto secundario del tratamiento con un fármaco, que puede ser un uso sistémico de IL-2 para tratar cánceres.

En una realización, el angioedema puede ser un angioedema inducido por alérgeno o un angioedema no inducido por alérgeno. El angioedema inducido por alérgeno puede ser un angioedema laríngeo, que puede producirse después de una alergia alimentaria o envenenamiento por picadura de himenópteros. El angioedema no inducido por alérgeno puede ser una deficiencia del inhibidor del factor 1 de complemento o angioedema inducido por colorante de contraste en una técnica de obtención de imágenes.

En una realización, la anafilaxis puede ser una reacción anafilactoide inducida por alérgeno o no alérgica. La reacción anafilactoide no alérgica puede deberse a un colorante de contraste.

En una realización, la permeabilidad vascular sistémica puede estar asociada con endotoxemia.

También se desvela en el presente documento un método para tratar la congestión nasal, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una composición que comprende el péptido. La congestión nasal puede estar asociada con rinitis alérgica o no alérgica. La congestión nasal puede estar relacionada con un irritante o estar relacionada con un virus respiratorio.

### Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra que el agotamiento de EB3 inhibe la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos en respuesta a la activación del receptor activado por proteasa (PAR)-1. A. Se cargaron HMVEC que expresaban shRNA (pequeño ARN en horquilla) para EB1, EB3 y Luciferasa con Fura 2-AM y se calculó la relación 340 Fura (unido a Ca<sup>2+</sup>)/380 (Fura Libre) después de la estimulación de las células con trombina (50 nM) en ausencia (-[Ca<sup>2+</sup>]<sub>0</sub>) y en presencia ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>0</sub> 1,5 nM) de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Flecha, momento de adición de trombina. Obsérvese que la delección de EB3 redujo notablemente el aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular. B. El gráfico muestra la media ± DT para la liberación y entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por trombina calculada como un aumento máximo con respecto al valor basal. El aumento está normalizado con respecto a las células de control no transfectadas en el mismo cubreobjetos (n = 9).

La Figura 2 muestra la interacción de EB3 con IP3R3 y TRPC1 en el contexto de inflamación pulmonar. Ratones KO WT (de tipo silvestre) y TLR4 recibieron una sola inyección intraperitoneal (i.p.) de endotoxina de lipopolisacáridos (LPS), el componente de la membrana externa de bacterias Gram-negativas, que induce una fuerte respuesta inmunitaria en mamíferos, a 10 mg/kg de peso corporal. Los pulmones se aislaron en los momentos indicados. EB3 se trató con IP en homogeneizados de pulmón entero. Los precipitados resultantes se sondaron para TRPC1, IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y EB3. Obsérvese que la delección de TLR4 (receptor de LPS) altera la interacción de EB3 con TRPC1. También previene el aumento en la unión a IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. Obsérvese que la unión de EB3 a IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> en pulmones TLR4<sup>-/-</sup> es

comparable a WT. Los datos son representativos de 2 experimentos independientes.

La Figura 3 muestra un alineamiento de receptores de IP<sub>3</sub> humanos (794-814 aa de IP3R de tipo 3) con el motivo de unión a EB (destacado en rojo). El péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) se muestra en verde en la parte inferior.

La Figura 4 muestra una representación de cintas de la estructura de EB3 (magenta) y el péptido derivado de IP3R3 (SEQ ID NO: 1) (varilla y esfera verde) acoplado en el surco de unión hidrófobo de EB3; se muestra una rotación de 180°. El péptido derivado de IP3R3 se acopló usando un programa Z-Dock junto con el software de Discovery Studio 3.0. Se calculó una energía de unión entre el péptido y EB3 de -68,882 kcal/mol.

La Figura 5 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) inhibe la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el RE en respuesta a la activación de PAR-1. A. Se cargaron HMVEC pretratadas con péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> unido a AP o péptido de control (AP) con Fura 2-AM y se calculó la relación 340/380 después de la estimulación de las células con trombina (50 nM) en ausencia y en presencia de Ca<sup>2+</sup> extracelular. Flecha, momento de adición de trombina. B. El gráfico muestra la media ± DT para la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por trombina y la entrada calculada como un aumento máximo con respecto al valor basal. El aumento está normalizado para las células de control no tratadas del mismo experimento (n = 4).

La Figura 6 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) inhibe la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> en preparaciones pulmonares *ex vivo*. Los pulmones aislados se sometieron a una perfusión de equilibrio de 20 min seguido de 30 min de perfusión con péptido AP-IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 10 µM. 5 minutos después, se infundió péptido TFLLRN-NH2 agonista de PAR-1 (PAR-1 a.p.) 30 µM, durante 20 min (grupo IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>+ PAR-1). Otro grupo se infundió solo con el péptido agonista de PAR-1 30 µM (grupo PAR-1). Los pulmones se usaron posteriormente para preparar un homogeneizado pulmonar que se usó para determinar el efecto del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> sobre la interacción EB3/IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. EB3 se inmunoprecipitó con anticuerpo específico y los precipitados resultantes se sondaron para EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. Obsérvese que la activación del receptor PAR-1 aumenta significativamente la interacción EB3/IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (grupo PAR-1) en comparación con el nivel basal (grupo de control), mientras que la perfusión del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> inhibe esta interacción en el sistema microvascular pulmonar activado.

La Figura 7 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) mitiga el aumento de la permeabilidad vascular pulmonar ( $K_{f.c.}$ , coeficiente de filtración microvascular) en respuesta a la activación de PAR-1. Se sometieron preparaciones pulmonares *ex vivo* a una perfusión de equilibrio de 20 minutos seguido de 30 minutos de perfusión con péptido AP-IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 10 µM. Cinco minutos después, se infundió péptido agonista de PAR-1 30 µM TFLLRN-NH2 (PAR-1 a.p.) durante 20 min antes de la medición de  $K_{f.c.}$ . n = 3-5 por grupo. Barras±DT \*p<0,05 por ANOVA. Obsérvese que no hay un cambio significativo en la permeabilidad vascular en respuesta a la activación de PAR-1 en los pulmones sometidos a perfusión con AP-IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>.

La Figura 8 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) mitiga la infiltración de los neutrófilos en pulmón en el contexto de una inflamación inducida por LPS. Los ratones recibieron una sola inyección i.p. de LPS (30 mg/kg de peso corporal; LPS de *E. coli* O111:B4; dosis DL50) y se usaron para el análisis a 2 y 6 h. Los pulmones se sometieron a perfusión con PBS, se pesaron, se congelaron y se usaron para medir la actividad mieloperoxidasa (MPO) de pulmón, una medida de los neutrófilos pulmonares (PMN) en los pulmones. n = 6 ratones/grupo.

La Figura 9 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) previene la letalidad en septicemia inducida por LPS. Los ratones tratados con péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> antes de la inyección de LPS demostraron una reducción de la mortalidad en ratones expuestos a DL50 (30 mg/kg LPS, A) y ratones de control expuestos a LD90 (50 mg/kg LPS, B). (n = 11-15 ratones/grupo, p<0,001 AP-IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> frente al tratamiento con control (control AP) por ANOVA. Los ratones se anestesiaron antes de la inyección retroorbital i.v. de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> con una mezcla de ketamina, 10 mg/ml; xilazina, 0,25 mg/ml y acepromazina, 0,25 mg/ml.

La Figura 10 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1) previene la letalidad en septicemia polimicrobiana. Los ratones tratados con péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> experimentaron una mortalidad reducida en el periodo de 120 h después de la CLP (ligadura cecal y perforación). En ratones CD-1 de 6-8 semanas de edad, se inyectó i.v. péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (1 µM/kg de peso corporal) 30 min antes y 24 y 48 horas después de la cirugía CLP. El ciego se ligó en su punto medio y el contenido cecal se hizo avanzar suavemente hacia la parte distal. El ciego se perforó a medio camino entre la ligadura y la punta del ciego en una dirección mesentérica-antimesentérica usando una aguja de calibre 16. Se extruyó una pequeña cantidad de heces a través de los orificios de penetración tanto mesentéricos como antimesentéricos. En los controles simulados, solo se realizó laparotomía. Los ratones se anestesiaron. La supervivencia fue significativamente mayor en el grupo del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> que en el control (n = 10 ratones/grupo). La diferencia en mortalidad se evaluó por la prueba de Mantel-Cox (prueba logrank) (p < 0,05).

La Figura 11 muestra la respuesta a la dosis de péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> sobre la supervivencia de los ratones. En ratones CD-1 tratados con las dosis indicadas de péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> se inyectaron i.p. LPS a una dosis DL80 (50 mg/kg de LPS) y se supervisaron durante 5 días. Se representó la tasa de supervivencia (%) frente a la dosis de péptido en escala logarítmica. La curva dosis-respuesta sigmoidea se ajustó a los puntos de datos. n = 10 ratones/grupo. Los ratones se anestesiaron antes de la inyección retroorbital de péptido con isoflurano al 2,5 % en aire ambiente en una cámara

de inducción de anestesia. La anestesia se mantuvo durante la inyección i.v. usando una máscara para roedores de diseño especial con un tubo coaxial (Harvard Apparatus, AH 72-3026).

5 La Figura 12 muestra una representación en cintas de EB3 (magenta) en el complejo con EBIN (SEQ ID NO: 3) (varilla verde) y péptido  $IP_3R_3$  (varilla amarilla) (SEQ ID NO: 1). La energía de unión calculada es -68,882 y -60,251 para IPR y EBIN, respectivamente.

10 La Figura 13 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) inhibe la interacción entre  $IP_3R_3$  y EB3. Se expusieron HPAEC pretratadas con AP-EBIN 1  $\mu M$  o péptido de control (AP) a trombina 50 nM. La interacción entre EB3 e  $IP_3R_3$  se analizó a diferentes puntos de tiempo después de la estimulación con trombina. EB3 se inmunoprecipitó con Ac específicos y los precipitados resultantes se sondaron para EB3 e  $IP_3R_3$ . EBIN redujo notablemente la interacción EB3- $IP_3R_3$  inicialmente y después del tratamiento con trombina.

15 La Figura 14 muestra que Myr-EBIN (SEQ ID NO: 3) mitiga el aumento inducido por agonista en el calcio intracelular.  $[Ca^{2+}]_i$  transitoria después de la estimulación de monocapas de HPAEC con trombina 50 nM (A) o histamina 90  $\mu M$  (B). Valor medio; n=20 células. Flecha, momento de estimulación. Obsérvese que EBIN (indicadores azules) redujo notablemente  $[Ca^{2+}]_i$  transitoria en las células tratadas con el péptido de control (indicadores rojos) (pérdida de unión; FAEIPTI (SEQ ID NO: 4)).

20 La Figura 15 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) atenúa la hiperpermeabilidad paracelular endotelial inducida por agonista. Cambios en resistencia eléctrica transendotelial (TER) de monocapas de HPAEC en respuesta a a-trombina 50 nM (A) e histamina 50  $\mu M$  (B). Los valores de TER se normalizaron con respecto a la resistencia basal. Myr-EBIN (gráfico rojo) impidió el cambio de forma celular y la hiperpermeabilidad paracelular en respuesta a trombina e histamina, como se observa en las células tratadas con péptido de control (gráfico azul).

25 La Figura 16 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) inhibe la producción de NO inducida por agonista. Se pretrataron HPAEC con péptido de control (pérdida de actividad) o Myr-EBIN y se midió la producción de NO basal (A, en respuesta a la adición de L-arginina) e inducida por agonista (B, trombina e histamina) durante la primera estimulación de 20 min. EBIN no afectaba al nivel basal de NO, pero atenúa significativamente el NO inducido por agonista. \*, p<0,01 y \*\*, p<0,01.

30 La Figura 17 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) previene la vasodilatación inducida por histamina *in vivo*. Medición de la presión sanguínea en ratones despiertos - se anestesiaron ratones y se prepararon quirúrgicamente para la colocación de catéteres arteriales (carótida) y venosos (yugular externa). Una hora después de la cirugía, se controló la presión sanguínea directamente usando un transductor de presión. Se realizaron inyecciones intravenosas (i.v.) posteriores de péptido AP-EBIN (1  $\mu M/kg$  de peso corporal; verde) o péptido AP de control (rojo) e histamina (10 mg/kg de peso corporal) a través del catéter de la vena yugular; la flecha indica el momento de la inyección. Obsérvese que EBIN no tuvo ningún efecto sobre la presión sanguínea inicial e impidió la reducción de la presión sanguínea en respuesta a histamina. n=6 ratones/grupo.

35 La Figura 18 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) previene la letalidad por septicemia inducida por LPS. Los ratones tratados con EBIN experimentan una mortalidad reducida en el período de 120 h después de la inyección de LPS a una dosis DL90 (50 mg/kg de LPS de *E. coli* 0111:B4). Se expusieron ratones CD1 macho por inyección intraperitoneal (i.p.) a dosis DL90 de LPS. Los grupos de control y experimental recibieron la inyección retroorbital, intravenosa (i.v.) de EBIN unido al extremo C del péptido antennapedia (AP), al que son permeables las células, o AP solo a una concentración de 1  $\mu M/kg$ . Los ratones se inyectaron tres veces, 30 min antes y 1 h y 24 h después de la administración de LPS. Los ratones se anestesiaron antes de la inyección retro-orbital con una mezcla de ketamina (10 mg/ml), xilazina (0,25 mg/ml) y acepromazina (0,25 mg/ml).

40 La Figura 19 compara el efecto del tratamiento previo y posterior con EBIN (SEQ ID NO: 3) sobre la letalidad por septicemia inducida por LPS. Los ratones tratados con EBIN experimentan una mortalidad reducida en el período de 120 h después de la inyección de LPS a una dosis DL90 (50 mg/kg de LPS de *E. coli* 0111:B4). Se expusieron ratones CD1 macho por inyección intraperitoneal (i.p.) de dosis DL90 de LPS. Los grupos experimental y de control recibieron una inyección en la vena de la cola (i.v.) de Myr-EBIN 30 min antes (tratamiento previo) o 30 min después (tratamiento posterior) del LPS o péptido de pérdida de unión de control Myr a una concentración de 1  $\mu M/kg$ . En el grupo de tratamiento previo, los ratones se inyectaron tres veces, 30 min antes y 1 h y 24 h después de la administración de LPS; en el grupo de tratamiento, los ratones se inyectaron dos veces, 30 min y 24 h después de la administración de LPS. Los ratones se anestesiaron antes de la inyección retroorbital con una mezcla de ketamina (10 mg/ml), xilazina (0,25 mg/ml) y acepromazina (0,25 mg/ml). El tratamiento posterior con EBIN muestra alguna mejora de la supervivencia, aunque no significativa.

45 La Figura 20 muestra que EBIN (SEQ ID NO: 3) previene la extravasación vascular subcutánea después de una reacción anafiláctica mediada por IgE. Los ratones recibieron una inyección intradérmica de IgE-HSA en la oreja (A) y en el lomo (B) y, 24 horas después, inyección iv de Azul de Evans y HSA (1-3) o solución salina (4-5). Los grupos 1 y 4 recibieron solución salina, 2 — péptido de control (pérdida de unión) y 3 y 5 — inyección iv de Myr-EBIN (1  $\mu M/kg$ ) 30 min antes de HSA. Obsérvese que la inyección de HSA dio como resultado una extravasación vascular

local, que se atenuó significativamente por EBIN (grupo 3). C. Gráfico de barras que demuestra la extravasación vascular de Azul de Evans. Se extrajo Azul de Evans del tejido de la oreja y se midió la concentración de Azul de Evans a  $\lambda=620$  nm y se normalizó con respecto al peso del tejido. \*,  $p < 0,05$ ,  $n = 6$  ratones/grupo.

- 5 La Figura 21 muestra el papel de EB3 en la hiperpermeabilidad inducida por inflamación de la barrera endotelial. EB3 establece interacciones transitorias de los extremos de MT en crecimiento con  $IP_3R_3$ , sensibiliza al  $IP_3R_3$  a  $IP_3$  y regula positivamente tanto la liberación de  $Ca^{2+}$  desde los depósitos como la entrada de  $Ca^{2+}$  dependiente de SOC durante la inflamación. Esto tiene como resultado la amplificación de la señalización por  $Ca^{2+}$  y un aumento de la permeabilidad a través de la fosforilación mediada por PKC $\alpha$  de p120-catenina y la contractilidad de acto-miosina.

10

### Descripción detallada

Los inventores han hecho el sorprendente descubrimiento de que péptidos derivados del dominio de interacción con EB3 del receptor de inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) de tipo 3 ( $IP_3R_3$ ) reducen la interacción entre la proteína 3 de unión al extremo (EB3) e  $IP_3R_3$ , y mitigan el aumento de la respuesta de permeabilidad endotelial asociada con cambios en la forma celular.

15

Basándose en los Ejemplos presentados más adelante, pero sin limitarse por ninguna teoría, el papel de EB3 en la hiperpermeabilidad inducida por inflamación de la barrera endotelial se centra en su capacidad de establecer interacciones transitorias de extremos de MT en crecimiento con  $IP_3R_3$ . Como resultado, EB3 sensibiliza a  $IP_3R_3$  frente a  $IP_3$  y regula positivamente la liberación de  $Ca^{2+}$  desde el retículo endoplásmico (RE). Esto conduce a la entrada de  $Ca^{2+}$  dependiente de SOC y a la amplificación de la señalización de  $Ca^{2+}$ . La mayor concentración de  $Ca^{2+}$  citosólico induce la fosforilación mediada por PKC $\alpha$  de la p120-catenina, dando como resultado una disociación de adhesiones de VE-cadherina. También facilita la contractilidad de acto-miosina dependiente de RhoA que tiene como resultado cambios en la forma de las células. Véase la Figura 21.

20

25

Los métodos y materiales descritos más adelante mitigan el aumento de respuesta de permeabilidad endotelial asociada con los cambios de la forma celular y, por lo tanto, son útiles en el tratamiento de lesiones pulmonares, incluyendo la extravasación vascular mediada por inflamación en los pulmones y el desarrollo de edema o edema de cualquier otro órgano, que puede estar asociado con septicemia, reacción anafiláctica o respuesta inmunitaria aguda. Los métodos y materiales también pueden usarse para atenuar la extravasación vascular crónica durante procesos patológicos, tales como inflamación crónica, cáncer, asma y aterogénesis.

30

### 1. Definiciones

35

La terminología usada en el presente documento tiene el fin de describir realizaciones particulares únicamente y no pretende ser limitante. Como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

40

Cuando se mencionan intervalos numéricos en el presente documento, se contempla explícitamente cada número intermedio entre los límites con el mismo grado de precisión. Por ejemplo, en el caso del intervalo de 6-9, se contemplan los números 7 y 8 además de 6 y 9 y, en el caso del intervalo 6,0-7,0, se contemplan explícitamente los números 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 y 7,0.

45

#### a. fragmento

"Fragmento", como se usa en el presente documento, puede hacer referencia a una parte de un péptido, polipéptido o secuencia de ácido nucleico de referencia.

50

#### b. idéntico

"Idéntico" o "identidad", como se usa en el presente documento en el contexto de dos o más polipéptidos o secuencias de nucleótidos, puede significar que las secuencias tienen un porcentaje especificado de restos o nucleótidos que son iguales en una región especificada. El porcentaje puede calcularse alineando óptimamente las dos secuencias, comparando las dos secuencias sobre la región especificada, determinando el número de posiciones en las que aparecen los restos idénticos en las dos secuencias para producir el número de posiciones que corresponden, dividiendo el número de posiciones que corresponden por el número total de posiciones en la región especificada y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencia. En casos en los que las dos secuencias son de longitudes diferentes o el alineamiento produce uno o más extremos escalonados y la región de comparación especificada incluye solo una secuencia, los restos de la secuencia única se incluyen en el denominador, pero no en el numerador del cálculo.

55

60

#### c. Péptido

Un "péptido" o "polipéptido", como se usa en el presente documento, puede hacer referencia a una secuencia de

65

aminoácidos asociada y puede ser natural, sintética o una modificación o combinación de natural y sintética.

#### d. sustancialmente idéntico

5 “Sustancialmente idéntico”, como se usa en el presente documento, puede significar que una primera y segunda proteínas o secuencias de nucleótidos son al menos un 50%-99% idénticas sobre una región de 6-100 o más nucleótidos o aminoácidos.

#### e. tratar

10 “Tratar” o “tratamiento” puede significar, cada uno, aliviar, suprimir, reprimir, eliminar, prevenir o ralentizar la aparición de síntomas, signos clínicos o una patología subyacente de una afección o trastorno en una base temporal o permanente. La prevención de una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto antes de la aparición de la enfermedad. La supresión de una afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la inducción de la afección o trastorno, pero antes de su aparición clínica. La represión de la afección o trastorno implica administrar un agente de la presente invención a un sujeto después de la aparición clínica de la enfermedad.

#### f. variante

20 Una “variante” puede significar un péptido o polipéptido que difiere en la secuencia de aminoácidos por inserción, delección o sustitución conservativa de aminoácidos, pero conserva al menos una actividad biológica. Los ejemplos representativos de “actividad biológica” incluyen la capacidad de unirse a una proteína de unión al extremo, un receptor de tipo toll (TLR) y de unirse a un anticuerpo específico. Variante también puede significar una proteína con una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a una proteína mencionada con una secuencia de aminoácidos que conserva al menos una actividad biológica. En la técnica se reconoce que una sustitución conservativa de un aminoácido, es decir, el reemplazo de un aminoácido con un aminoácido diferente de propiedades similares (por ejemplo, hidrofilia, grado y distribución de regiones cargadas) implica típicamente un cambio minoritario. Estos cambios minoritarios pueden identificarse, en parte, considerando el índice hidropático de aminoácidos, como se entiende en la técnica. Kyte *et al.*, J. Mol. Biol. 157: 105-132 (1982). El índice hidropático de un aminoácido está basado en una consideración de su hidrofobia y carga. Se sabe en la técnica que los aminoácidos de índices hidropáticos similares pueden sustituirse y conservar aun así la función de la proteína. En un aspecto, se sustituyen aminoácidos que tienen índices hidropáticos de  $\pm 2$ . La hidrofilia de aminoácidos también puede usarse para revelar sustituciones que darían como resultado proteínas que conservan la función biológica. Una consideración de la hidrofilia de aminoácidos en el contexto de un péptido permite el cálculo de la mayor hidrofilia media local de ese péptido, una medida útil que, según se ha notificado, se correlaciona bien con la antigenicidad e inmunogenicidad. Patente de Estados Unidos n.º 4.554.101. La sustitución de aminoácidos que tienen valores de hidrofilia similares puede dar lugar como resultado péptidos que conservan la actividad biológica, por ejemplo, la inmunogenicidad, como se entiende en la técnica. Las sustituciones pueden realizarse con aminoácidos que tienen los mismos valores de hidrofilia con un margen  $\pm 2$ . Tanto el índice de hidrofobia como el valor de hidrofilia de los aminoácidos se ven influenciados por la cadena lateral particular de ese aminoácido. De forma consecuente con esta observación, se entiende que las sustituciones de aminoácidos que son compatibles con la función biológica dependen de la similitud relativa de los aminoácidos y, particularmente, de las cadenas laterales de esos aminoácidos, como se revela por la hidrofobia, hidrofilia, carga, tamaño y otras propiedades.

## 2. Péptido

50 En el presente documento se desvela un péptido que puede comprender la secuencia de aminoácidos KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2) (también denominado en el presente documento péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) (también denominado en el presente documento péptido inhibidor de unión al extremo o “EBIN”), un péptido desvelado en la Tabla 3 del presente documento, un fragmento del mismo o una variante del mismo. La variante puede comprender una sustitución conservativa. Un primer aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), o un fragmento de los mismos, en donde el fragmento reduce la interacción entre la Proteína 3 de Unión al Extremo (EB3) y el Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato Tipo 3 (IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>). El péptido puede comprender una secuencia de motivo consenso de unión a EB, tal como la secuencia consenso de unión a EB de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, o un fragmento de la misma. La secuencia consenso de unión a EB de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> puede ser Ser/Thr-x-Ile-Pro. El péptido puede consistir en KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), KFARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), una secuencia consenso que comprende Ser/Thr-x-Ile-Pro, un péptido desvelado en la Tabla 3 del presente documento, un fragmento de los anteriores o una variante conservativa de los anteriores. La variante puede comprender cualquier secuencia peptídica que contenga la secuencia Ser/Thr-x-Ile-Pro, la secuencia del motivo consenso de unión a EB mínima.

65 El péptido puede estar conjugado, miristoilado o unido a otro péptido, tal como un péptido portador. El péptido puede ser un péptido antennapedia.

### 3. Métodos de tratamiento

Otro aspecto de la presente invención proporciona un péptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), o un fragmento de las mismas, para uso en el tratamiento de lesiones pulmonares, síndromes de permeabilidad vascular sistémica, angioedema, anafilaxis o congestión nasal asociada con rinitis alérgica o no alérgica, en donde el péptido reduce la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. La lesión pulmonar puede ser inflamación pulmonar, que puede ser una extravasación vascular mediada por inflamación y/o el desarrollo de edema. La lesión pulmonar puede ser una lesión pulmonar aguda. La lesión pulmonar también puede ser una extravasación vascular crónica tal como la observada en pacientes con asma. El tratamiento puede atenuar la extravasación vascular crónica. La lesión pulmonar puede ser hiperpermeabilidad de vasos en el pulmón, incluyendo permeabilidad vascular sistémica, tal como endotoxemia. La lesión pulmonar puede estar asociada con septicemia, inflamación, traumatismo múltiple severo, aspiración de saliva/contenidos gástricos, neumonía por aspiración, shock, estar a punto de ahogarse, transfusiones múltiples, inhalación de irritantes o humos tóxicos, aterogénesis, lesión mecánica (lesión inducida por ventilación) o exposición a la radiación. Además, el péptido de la invención puede utilizarse para tratar el asma y/o mejorar la función pulmonar y la salud general de pacientes con asma. El asma puede ser asma alérgica, que puede ser crónica o aguda.

En una realización, el péptido de la invención es para uso en el tratamiento de anafilaxis, tal como anafilaxis inducida por alérgenos, y reacciones anafilactoides no alérgicas tales como reacciones a colorantes de contraste. Además, en una realización, el péptido es para tratar angioedema, incluyendo angioedema inducido por alérgenos, tal como edema laríngeo, que puede producirse por alergia alimentaria o envenenamiento por picadura de himenóptero. El angioedema también puede ser un angioedema no inducido por alérgenos, tal como deficiencia de inhibidor del factor 1 del complemento o reacciones anafilactoides inducidas por colorantes de contraste en técnicas de obtención de imágenes.

En otra realización, el péptido de la invención es para tratar síndromes de permeabilidad vascular sistémica. Los síndromes pueden deberse a endotoxemia, traumatismo o transfusiones múltiples. Los síndromes también pueden aparecer como un efecto secundario de un tratamiento con fármaco. El tratamiento con fármaco puede ser el uso sistémico de IL-2 para tratar cánceres. Además, el péptido puede ser para uso en el tratamiento de congestión nasal. La congestión puede estar asociada con rinitis alérgica o no alérgica. La congestión puede estar relacionada con un irritante o con un virus respiratorio.

El péptido puede ser para la administración al mamífero de una composición que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del péptido. La composición puede ser una formulación farmacéutica. La composición que comprende el péptido puede ser para la administración en combinación con uno o más péptidos, compuestos y/o composiciones farmacéuticas distintas útiles para tratar lesiones pulmonares. Dichos uno o más péptidos, compuestos y/o composiciones farmacéuticas distintas pueden ser cualquier agente que trate la lesión pulmonar incluyendo, pero sin limitación, reductores de la precarga tales como nitroglicerina, y diuréticos tales como furosemida (Lasix). Dichas modificaciones dilatan las venas de los pulmones y de otras partes del cuerpo, lo cual reduce la presión de fluido que entra en el corazón y los pulmones. Otros de dichos uno o más compuestos incluyen reductores de postcarga. Estos fármacos dilatan los vasos periféricos y reducen la carga de presión del ventrículo izquierdo. Algunos ejemplos de medicaciones reductoras de postcarga incluyen nitroprusiato (Nitropress), enalapril (Vasotec) y captopril (Capoten).

#### a. Sujeto

El sujeto puede ser un mamífero, que puede ser un ser humano. Antes del diagnóstico, el sujeto puede tener un riesgo de lesión pulmonar debido a la exposición a uno o más factores de riesgo, una afección cardíaca, etc. Dichos uno o más factores de riesgo pueden incluir, por ejemplo, que el sujeto tiene una historia familiar de cáncer, la edad, tabaquismo, bebidas alcohólicas y/o deficiencias en la dieta. El sujeto puede estar expuesto a humos tóxicos o a radiación, ventilación mecánica. El sujeto puede tener quemaduras, inflamación, traumatismo múltiple severo, aspiración de saliva/contenidos gástricos, neumonía de aspiración, septicemia, shock, puede haber estado a punto de ahogarse, transfusiones múltiples.

#### b. Administración

La administración de los péptidos puede ser sistémica, oral, parenteral, sublingual, transdérmica, rectal, transmucosa, tópica, mediante inhalación, mediante administración bucal, nasal o combinaciones de las mismas. La administración parenteral incluye, pero sin limitación, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, intratecal e intraarticular. La administración también puede ser subcutánea, intravenosa, a través de un conducto respiratorio o intratumoral. Para uso veterinario, el péptido puede administrarse como una formulación convenientemente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal. El veterinario puede determinar fácilmente el régimen de dosificación y la vía de administración que es más apropiada para un animal particular. Los péptidos pueden administrarse a un paciente humano, gato, perro, animal grande o un ave.



El péptido puede ser para la administración como una monoterapia o para la administración simultáneamente o metronómicamente con otros tratamientos, que pueden ser una cirugía o retirada de un tumor. El término “simultáneo” o “simultáneamente”, como se usa en el presente documento, significa que el péptido y el otro tratamiento se administrarán con una diferencia de 48 horas, preferentemente 24 horas, más preferentemente 12 horas, aún más preferentemente 6 horas y aún más preferentemente 3 horas o menos, entre sí. El término “metronómicamente”, como se usa en el presente documento, significa la administración del péptido en momentos diferentes del otro tratamiento y a cierta frecuencia con respecto a la administración repetida.

El péptido puede ser para administración en cualquier momento antes de otro tratamiento, incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min y 1 min. El péptido puede ser para administración en cualquier momento antes de un segundo tratamiento del péptido, incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min y 1 min.

El péptido puede ser para administración en cualquier momento después de otro tratamiento, incluyendo aproximadamente 1 min, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 6 min, 7 min, 8 min, 9 min, 10 min, 15 min, 20 min, 25 min, 30 min, 35 min, 40 min, 45 min, 50 min, 55 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h, 16 h, 18 h, 20 h, 22 h, 24 h, 26 h, 28 h, 30 h, 32 h, 34 h, 36 h, 38 h, 40 h, 42 h, 44 h, 46 h, 48 h, 50 h, 52 h, 54 h, 56 h, 58 h, 60 h, 62 h, 64 h, 66 h, 68 h, 70 h, 72 h, 74 h, 76 h, 78 h, 80 h, 82 h, 84 h, 86 h, 88 h, 90 h, 92 h, 94 h, 96 h, 98 h, 100 h, 102 h, 104 h, 106 h, 108 h, 110 h, 112 h, 114 h, 116 h, 118 h y 120 h. El péptido puede ser para administración en cualquier momento antes o después de un segundo tratamiento del péptido, incluyendo aproximadamente 120 h, 118 h, 116 h, 114 h, 112 h, 110 h, 108 h, 106 h, 104 h, 102 h, 100 h, 98 h, 96 h, 94 h, 92 h, 90 h, 88 h, 86 h, 84 h, 82 h, 80 h, 78 h, 76 h, 74 h, 72 h, 70 h, 68 h, 66 h, 64 h, 62 h, 60 h, 58 h, 56 h, 54 h, 52 h, 50 h, 48 h, 46 h, 44 h, 42 h, 40 h, 38 h, 36 h, 34 h, 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h, 55 min, 50 min, 45 min, 40 min, 35 min, 30 min, 25 min, 20 min, 15 min, 10 min, 9 min, 8 min, 7 min, 6 min, 5 min, 4 min, 3 min, 2 min y 1 min.

### c. Formulaciones

Los péptidos proporcionados en el presente documento pueden estar en forma de comprimidos o grageas formulados de una manera convencional. Por ejemplo, los comprimidos y cápsulas para administración oral pueden contener excipientes convencionales que pueden ser agentes aglutinantes, cargas, lubricantes, disgregantes y agentes humectantes. Los agentes de unión incluyen, pero sin limitación, jarabe, goma arábica, gelatina, sorbitol, tragacanto, mucílago de almidón y polivinilpirrolidona. Las cargas pueden ser lactosa, azúcar, celulosa microcristalina, almidón de maíz, fosfato cálcico y sorbitol. Los lubricantes incluyen, pero sin limitación, estearato de magnesio, ácido esteárico, talco, polietilenglicol y sílice. Los disgregantes pueden ser almidón de patata y almidón glicolato sódico. Los agentes humectantes pueden ser lauril sulfato sódico. Los comprimidos pueden estar recubiertos de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica.

Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden ser formulaciones líquidas tales como suspensiones acuosas u oleosas, soluciones, emulsiones, jarabes y elixires. Los péptidos también pueden formularse como un producto seco para reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes del uso. Dichas preparaciones líquidas pueden contener aditivos tales como agentes de suspensión, agentes emulsionantes, vehículos no acuosos y conservantes. Los agentes de suspensión pueden ser jarabe de sorbitol, metil celulosa, jarabe de glucosa/azúcar, gelatina, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, gel de estearato de aluminio y grasas comestibles hidrogenadas. Los agentes emulsionantes pueden ser lecitina, monooleato de sorbitano y goma arábica. Los vehículos no acuosos pueden ser aceites comestibles, aceite de almendras, aceite de coco fraccionado, ésteres oleosos, propilenglicol y alcohol etílico. Los conservantes pueden ser p-hidroxibenzoato de metilo o propilo y ácido sórbico.

Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como supositorios, que pueden contener bases de supositorio tales como manteca de cacao o glicéridos. Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse para inhalación, que puede estar en una forma tal como una solución, suspensión o emulsión que puede administrarse como un polvo seco o en forma de un aerosol usando un propulsor, tal como diclorodifluorometano o triclorofluorometano. Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como formulaciones transdérmicas que comprenden vehículos acuosos o no acuosos tales como cremas, pomadas, lociones, pastas, emplastos medicados, parches o membrana.

Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse para administración parenteral,

tal como por inyección, inyección intratumoral o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden estar en forma de suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación que incluyen, pero sin limitación, agentes de suspensión, estabilizantes y dispersantes. El péptido también puede proporcionarse en forma de polvo para reconstituirse con un vehículo adecuado que incluye, pero sin limitación, agua estéril sin pirógenos.

Los péptidos proporcionados en el presente documento también pueden formularse como una preparación de depósito, que puede administrarse por implantación o por inyección intramuscular. Los péptidos pueden formularse con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (como una emulsión en un aceite aceptable, por ejemplo), resinas de intercambio iónico, o derivados moderadamente solubles (como una sal moderadamente soluble, por ejemplo).

#### d. Dosificación

La cantidad terapéuticamente eficaz requerida para uso en terapia varía con la naturaleza de la afección a tratar, el periodo de tiempo que se desea activar la actividad de TLR y la edad/estado del paciente. Sin embargo, en general, las dosis empleadas para el tratamiento de seres humanos adultos típicamente están en el intervalo de 0,001 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg al día. La dosis puede ser de aproximadamente 0,05 mg/kg a aproximadamente 10 g/kg por día. La dosis deseada puede administrarse convenientemente en una sola dosis, o como múltiples dosis administradas a intervalos apropiados, por ejemplo, como dos, tres, cuatro o más subdosis al día. Pueden desearse o requerirse múltiples dosis.

La dosificación puede ser cualquier dosificación tal como aproximadamente 0,05 mg/kg, 0,06 mg/kg, 0,07 mg/kg, 0,08 mg/kg, 0,09 mg/kg, 0,1 mg/kg, 0,2 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,4 mg/kg, 0,5 mg/kg, 0,6 mg/kg, 0,7 mg/kg, 0,8 mg/kg, 0,9 mg/kg, 1 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg, 75 mg/kg, 100 mg/kg, 125 mg/kg, 150 mg/kg, 175 mg/kg, 200 mg/kg, 225 mg/kg, 250 mg/kg, 275 mg/kg, 300 mg/kg, 325 mg/kg, 350 mg/kg, 375 mg/kg, 400 mg/kg, 425 mg/kg, 450 mg/kg, 475 mg/kg, 500 mg/kg, 525 mg/kg, 550 mg/kg, 575 mg/kg, 600 mg/kg, 625 mg/kg, 650 mg/kg, 675 mg/kg, 700 mg/kg, 725 mg/kg, 750 mg/kg, 775 mg/kg, 800 mg/kg, 825 mg/kg, 850 mg/kg, 875 mg/kg, 900 mg/kg, 925 mg/kg, 950 mg/kg, 975 mg/kg, 1 g/kg, 2 g/kg, 3 g/kg, 4 g/kg, 5 g/kg, 6 g/kg, 7 g/kg, 8 g/kg, 9 g/kg o 10 g/kg.

#### 4. Kit

En el presente documento se desvela un kit, que puede usarse para tratar una lesión pulmonar. El kit puede comprender uno o más de los péptidos. Los péptidos pueden formar parte de una composición farmacéutica. El kit puede comprender además instrucciones para usar el kit y realizar la administración del péptido o formulación.

El kit también puede comprender uno o más recipientes, tales como viales o frascos, conteniendo cada recipiente un reactivo separado. El kit puede comprender además instrucciones por escrito, que pueden describir cómo realizar o interpretar el método descrito en el presente documento.

La presente invención tiene múltiples aspectos, ilustrados por los siguientes ejemplos no limitantes.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1 La reducción de EB3 inhibe la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos

Un trabajo previo sugirió el papel del citoesqueleto de MT en la regulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3 desde depósitos del RE. Se ensayó la capacidad de EB3 de regular la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde depósitos sensibles a IP3 aguas abajo de la señalización de PAR-1. Se determinaron los cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular en HMEC que expresaban shRNA contra EB1, EB3 y Luciferasa en respuesta a la activación de PAR-1 (Figura 1). Como las construcciones de siRNA (ARN pequeño de interferencia) basadas en vector de los presentes solicitantes se clonaron en un vector GFP-C1, se pudieron comparar los cambios en las células no transfectadas y transfectadas en el mismo cubreobjetos. El agotamiento de EB1 no tuvo ningún efecto sobre la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos en comparación con las células no transfectadas de control o células que expresaban shRNA contra Luciferasa. Por el contrario, el agotamiento de EB3 condujo a una notable inhibición de la liberación de Ca<sup>2+</sup>, dando como resultado de esta manera una reducción de la entrada de Ca<sup>2+</sup>. El efecto del agotamiento simultáneo de EB1 y EB3 fue comparable con el agotamiento de EB3 solo (Figura 1B). Estos datos sugieren que EB3 se requiere para el agotamiento de Ca<sup>2+</sup> del RE.

##### Ejemplo 2 Papel de la interacción de EB3 con IP3R en el mecanismo de liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3

Se determinó si EB3 interacciona con IP<sub>3</sub>R de tipo 3, cuya actividad es crítica para la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por trombina en EC (células endoteliales). Se expusieron ratones a una dosis subletal de LPS y se determinó la asociación de EB3 con IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y el canal TRPC1 (SOC). Como se muestra en la Figura 2, EB3 interacciona con IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> en el sistema microvascular endotelial en reposo y el nivel de esta interacción aumenta durante la inflamación

pulmonar inducida por LPS. De manera interesante, también se encontró TRPC1 en el EB3 precipitado en los pulmones que sufrían inflamación (3 h de exposición a LPS). Estos cambios no se observaron en ratones KO TLR4 (receptor de LPS), lo que indica la relación causal de estas interacciones y la inflamación.

- 5 De manera interesante, IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> contiene el motivo consenso de unión a EB, Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP). Un péptido corto basado en la secuencia de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (KFARLWTEIPTAIT — SEQ ID NO: 1) (Figura 3) muestra una alta actividad de unión para EB3 con una energía libre de unión de -68,882 kcal/mol (Figura 4). El pretratamiento de la célula con la secuencia de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> unida al extremo C del péptido antenapedia (AP), al que es permeable la célula, a 10 nM redujo notablemente la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos en respuesta a la trombina (Figura 5A), lo que sugiere que la interacción entre IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> y EB3 es crítica en el mecanismo de activación de IP<sub>3</sub>R. Se compararon los efectos del péptido IP<sub>3</sub>R y taxol para regular la liberación de Ca<sup>2+</sup>. Se descubrió que el pretratamiento de células con 5 µg/ml de taxol durante 20 min antes de la estimulación por trombina inhibe la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde el RE en la misma medida que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (Figura 5B).

### 15 Ejemplo 3

#### **El péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> previene la extravasación vascular pulmonar inducida por inflamación y la letalidad en septicemia**

- 20 Para abordar el papel de la interacción EB3/IP<sub>3</sub>R en la regulación de la permeabilidad del endotelio vascular, los presentes solicitantes usaron preparaciones pulmonares *ex vivo*. El péptido se infundió en los pulmones durante 30 min antes de la infusión del péptido agonista de PAR-1 y se determinó la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> por ensayo IP (Figura 6). La activación del receptor PAR-1 aumentó significativamente la interacción EB3/IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> en comparación con el nivel basal, mientras que la perfusión del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> inhibió esta interacción en el sistema microvascular pulmonar activado. Por consiguiente, el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> mitigó el aumento en la permeabilidad de los vasos pulmonares, según se mide por cambios en el coeficiente de filtración microvascular, *K<sub>f</sub>c*. La Figura 7 demuestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> atenúa notablemente el aumento de permeabilidad microvascular en respuesta a la activación de PAR-1. Estos datos sugieren que la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R podría ser importante para la extravasación pulmonar inducida por la inflamación y el desarrollo de edema en los pulmones.

- 30 Ciertos estudios recientes demostraron que la extravasación vascular es un factor crítico que contribuye a la letalidad en la septicemia. Se ensayó el efecto farmacológico del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> en un modelo murino de septicemia inducida por LPS. Se expusieron ratones CD1 macho por inyección intraperitoneal (i.p.) de LPS (30 mg/kg de peso corporal) y se determinó la infiltración de los neutrófilos en el pulmón, una medida de la inflamación pulmonar. Los pulmones se perfundieron con PBS, se pesaron, se congelaron y se usaron para medir la actividad mieloperoxidasa (MPO) del pulmón, que es una firma de los neutrófilos activados. Como se muestra en la Figura 8, el tratamiento de ratones con péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> 30 min antes de la exposición a LPS redujo significativamente la infiltración de los neutrófilos en pulmón 2 y 6 h después de la exposición a LPS en comparación con el grupo tratado con el péptido de control. Esta observación sugiere que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> atenúa la inflamación y la lesión pulmonar inducida por LPS. Por consiguiente, los ratones que habían recibido un tratamiento de péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, 30 min antes y 1 h después de la administración de LPS, demostraron una notable mejora en la tasa de supervivencia de los grupos de control tanto con la exposición a DL50 como con la exposición a DL80 (Figura 9). Además, se determinó si el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> protege de la septicemia polimicrobiana inducida por ligadura cecal y perforación (CLP). La CLP produce peritonitis letal que va acompañada de una lesión pulmonar aguda (ALI). Es un método bien aceptado y clínicamente relevante en roedores experimentales. La Figura 10 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> mejoraba la supervivencia del animal después de la CLP. Mientras que el 90 % de los ratones de control morían en las primeras 48 h, los animales a los que se había inyectado IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> antes de la cirugía y 24 y 48 h después de la cirugía demostraron una tasa de supervivencia significativamente mayor.

- 50 Estos datos sugieren que el péptido derivado del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> podría usarse potencialmente para prevenir la hiperpermeabilidad pulmonar y para atenuar la extravasación vascular crónica durante procesos patológicos tales como inflamación y aterogénesis. La dosis-respuesta de péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> se ensayó adicionalmente en un modelo murino de septicemia inducida por LPS. Se expusieron ratones CD1 macho por inyección i.p. de LPS a una dosis DL80. Los ratones recibieron una inyección i.v. retroorbital de péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> a dosis de 0,01, 0,033, 0,1, 0,33, 1,0, 3,3 y 10 liM por kg de peso corporal. En los ratones se inyectó péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> tres veces, 30 min antes y 1 y 24 h después de la administración de LPS. Se representó un porcentaje de animales supervivientes en cada grupo en función de la dosis de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. La Figura 11 muestra que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> mejoró la tasa de supervivencia de los grupos de control empezando a 0,033 1,1 M/kg y alcanzó una eficacia máxima a 1 µM/kg. El aumento en la dosis de IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> no condujo a una mejora adicional, pero de manera importante, tampoco produjo la muerte de los animales. Estos datos sugieren que el péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> tiene baja toxicidad dentro de este intervalo de dosis. Se calculó una DE<sub>50</sub> (dosis eficaz, 50 %) de 80 nM/kg usando una ecuación logística de tres parámetros:

$$y = \text{mín.} + (\text{máx.} - \text{mín.}) / (1 + 10^{\text{LogDE}_{50} - x})$$

- 65 Donde mín. y máx. son el mínimo y máximo de respuesta. Los datos presentados sugieren que IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> es un fármaco potencial con una alta potencia y baja toxicidad. Al contrario que el taxol, no es de esperar que este fármaco

presente una toxicidad general.

EB3 regula positivamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos del RE y, por lo tanto, aumenta la permeabilidad de la barrera endotelial en respuesta a estímulos proinflamatorios. La interacción entre EB3 e  $\text{IP}_3\text{R}$  es importante en el mecanismo de liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{IP}_3$ . El péptido  $\text{IP}_3\text{R}_3$  previene la extravasación vascular mediada por la inflamación en los pulmones y el desarrollo de edema y mejora notablemente la supervivencia de los ratones en dos modelos diferentes de septicemia.

#### Ejemplo 4

##### Determinar el papel de regulación de EB3 de la señalización de $\text{Ca}^{2+}$ en el mecanismo de aumento de la permeabilidad endotelial y en la formación de edema pulmonar.

Los presentes solicitantes postulan que la interacción dinámica de EB3 en los extremos de MT con RE es necesaria para la propagación de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  y el aumento de la permeabilidad de la barrera endotelial en respuesta a mediadores proinflamatorios.

Hipótesis: la regulación por EB3 de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{IP}_3$  desde el RE es necesaria para el aumento dependiente de MT de la permeabilidad endotelial. Los presentes solicitantes abordarán la idea de que la acumulación de EB3 en los extremos de MT en crecimiento facilita la interacción transitoria de EB3 con  $\text{IP}_3\text{R}$  y regula positivamente la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos, produciendo de esta manera una entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  dependiente de SOC, la activación de la isoforma  $\text{PKC}\alpha$  dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la fosforilación mediada por  $\text{PKC}\alpha$  de p120-catenina y la internalización de la cadherina VE (como se postula por el modelo de la Figura 21).

#### Ejemplo 5

##### Papel de EB3 en la regulación del crecimiento persistente de MT y la activación de $\text{IP}_3\text{R}$ .

Los agentes desestabilizadores y estabilizadores de MT inhiben la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{IP}_3$  11-13. Los datos preliminares de los presentes solicitantes demuestran que el agotamiento de EB3, pero no de EB1, en células endoteliales también inhibe la liberación mediada por PAR-1 de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos. Los presentes solicitantes determinarán si EB3 regula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{IP}_3$  desde el RE indirectamente mediante la regulación de la dinámica de los MT. Los presentes solicitantes determinarán si la restauración del crecimiento persistente de MT en células en las que se ha agotado EB3 mediante la expresión del dímero de EB3 artificial como se muestra por los presentes solicitantes 20 también puede restaurar la liberación mediada por PAR-1 de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE. Como el dímero artificial EB3-NL-LZ carece completamente de cualquier dominio responsable de la unión a compañeros EB conocidos, no es de esperar que restaure la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por  $\text{IP}_3$  si la interacción entre EB3 e  $\text{IP}_3\text{R}$  es crítica para la activación de  $\text{IP}_3\text{R}$ . Por lo tanto, si los presentes solicitantes observaran una restauración de la actividad de  $\text{IP}_3\text{R}$  en las células que expresan los dímeros de EB3 artificiales, los presentes solicitantes concluirían que EB3 regula la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por agonista desde el RE indirectamente, a través de la dinámica de MT. Este experimento abordará la liberación mediada por trombina de  $\text{Ca}^{2+}$  desde el RE y la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular, evaluando esto mediante la obtención de imágenes radiométricas 340/380 de Fura2-AM en HMLVEC. Basándose en la validez de la hipótesis de los presentes solicitantes, estos predicen que la expresión de EB3-NL-LZ no restaurará la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  inducida por agonista desde el RE.

#### Ejemplo 6

##### Papel de la interacción de EB3 con $\text{IP}_3\text{R}$ en la distribución intracelular de $\text{IP}_3\text{R}$ .

Basándose en las premisas de los datos de los presentes solicitantes, se propuso que la interacción entre EB3 e  $\text{IP}_3\text{R}$  de tipo 3 podría ser importante en el mecanismo de activación del receptor.  $\text{IP}_3\text{R}$  contiene el motivo consenso Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (Figura 17), que es una firma específica de los compañeros de interacción con EB. La fosforilación de Ser o Thr en las proximidades de este motivo reduce notablemente la afinidad de EB1 por sus compañeros de unión conocidos. Los presentes solicitantes determinarán si el péptido corto de secuencia de  $\text{IP}_3\text{R}$  (798-811; KFARLWTEIPTAIT - SEQ ID NO: 1) fusionado con la secuencia de AP rompe la interacción entre  $\text{IP}_3\text{R}$  y EB3 y si inhibe la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  activada por  $\text{IP}_3$  inducida por trombina. Como existe alguna posibilidad de que el péptido pueda fosforilarse en las células, los presentes solicitantes expresarán el péptido  $\text{IP}_3\text{R}$  marcado con Avi y determinarán su fosforilación por autorradiografía. Si los presentes solicitantes descubren que el péptido experimenta fosforilación, se usará el péptido defectuoso en la fosforilación en el que la primera Thr se sustituirá por Ala (péptido defectuoso en la fosforilación, KFARLWAEIPTAIT - SEQ ID NO: 2) que es más potente para todos los demás estudios. La unión del péptido a EB3 se confirmará en células e *in vitro* por el ensayo co-IP y el ensayo pull-down. Los presentes solicitantes usarán este péptido para romper la interacción entre EB3 e  $\text{IP}_3\text{R}$  en las células. Es la expectativa de los presentes solicitantes que el péptido  $\text{IP}_3\text{R}$  inhiba la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  desde los depósitos en respuesta a la trombina.

Los presentes solicitantes investigarán si el agotamiento de EB3 o la inhibición de la interacción entre EB3 e IP3R con péptidos bloqueantes cambia la distribución intracelular de IP3R. IP3R de tipo 2 y 3 se expresan predominantemente en el sistema microvascular del endotelio pulmonar. El reclutamiento de IP3R de tipo 3 en las caveolas es necesario para la liberación de Ca<sup>2+</sup> inducida por agonista desde los depósitos. Considerando la afinidad intrínseca relativamente baja de IP3 por IP3R de tipo 3, la localización del receptor cerca de los sitios de generación de IP3 podría ser crítica para la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3. Por lo tanto, los presentes solicitantes ensayarán si EB3 regula el anclaje de la membrana del RE a las caveolas mediante la formación del complejo IP3R3/TRPC1/TRPC4. Los presentes solicitantes determinarán la distribución intracelular del receptor IP3R3 por tinción inmunofluorescente y por obtención de imágenes de células vivas en el transcurso de tiempo de la estimulación por trombina. Si los presentes solicitantes descubren que EB3 regula la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3 mediante el anclaje de IP3R3 a las caveolas, se determinará si EB3 facilita la interacción entre IP3R3 y TRPC1/TRPC4.

### Ejemplo 7

#### Papel de EB3 en el mecanismo de la fosforilación de IP3R inducida por agonista.

IP3R contiene 16 sitios potenciales para la CaM quinasa II (CaMKII) 26-28 y la fosforilación mediada por CaMKII aumenta la sensibilidad del receptor a IP3. Thr804, un sitio de fosforilación previsto de CaMKII (Figura 17) está localizado dentro de la región 651-1130, que es crítica para el acoplamiento funcional entre la unión de IP3 y la apertura del canal. Por lo tanto, la fosforilación de Thr804 podría ser importante en el mecanismo de apertura del canal inducida por IP3. EB3 se une a CaM y podría orquestar la activación espacial y temporal de CaMKII y la fosforilación del receptor. Para abordar esta idea, se determinará si el agotamiento de EB3 o la alteración de la interacción entre EB3 e IP3R con un péptido específico inhibe la fosforilación de IP3R. El nivel de fosforilación de IP3R se evaluará por autorradiografía. Es de esperar que tanto el agotamiento de EB3 como el péptido IP3R reduzcan el nivel de fosforilación de IP3R. Los sitios de fosforilación se determinarán por análisis fosfoproteómico. El IP3R endógeno se purificará a partir de HLMVEC antes y después del tratamiento con trombina usando perlas de concanavalina A. La especificidad de los sitios de CaMKII se determinará por comparación de los perfiles de fosforilación obtenidos con y sin inhibidores de CaMKII. Los presentes solicitantes mutarán sitios de CaMKII y determinará su significado en la distribución intracelular de IP3R3 y en el mecanismo de liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3.

Otra serie de experimentos determinará si la fosforilación dependiente de CaMKII de IP3R está acoplada a la unión del receptor a TRPC1/4 en la membrana plasmática. La fosforilación podría liberar IP3R de las puntas de MT en crecimiento e inducir su unión a TRPC1/4. Se observa la colocalización de CaMKII e IP3R3 en la región apical de enterocitos intestinales, células acinares pancreáticas y células mucosas de la superficie. Por lo tanto, podría darse la codistribución de CaMKII e IP3R3 en la superficie luminal de las células endoteliales. En primer lugar, los presentes solicitantes confirmarán la colocalización de IP3R3 con CaMKII en HLMVEC en reposo y estimuladas con trombina. Los presentes solicitantes también determinarán la interacción entre receptor y quinasa por análisis de FRET. La actividad de CaMKII se evaluará usando un biosensor basado en FRET, Camui 33 (obtenido en Yasunori Hayashi, Japón). El papel de EB3 en la activación espacial de CaMKII se determinará usando los mismos enfoques.

### Ejemplo 8

#### Papel de la interacción de EB3 con IP3R en el mecanismo de entrada de Ca<sup>2+</sup> provocada por SOC.

El agotamiento de los depósitos del RE es un mecanismo importante de activación de SOC y de entrada de Ca<sup>2+</sup> 34-36. Consecuentemente, los presentes solicitantes descubrieron que el agotamiento de EB3, pero no de EB1, reduce la entrada de Ca<sup>2+</sup>. Basándose en la premisa de los datos preliminares de los presentes solicitantes, se propuso la hipótesis de que el agotamiento de EB3 inhibe la activación inducida por trombina de TRPC1 y TRPC4, canales SOC importantes en las células endoteliales. Para tratar esta posibilidad directamente, se usarán HLMVEC tratadas con siRNA de EB3 o con péptido IP3R3 en el ensayo de fijación de membranas (patch clamp) de células enteras para medir la corriente hacia el interior sensible a La<sup>3+</sup> e inducida por trombina a -50 mV. Los presentes solicitantes también evaluarán la relación de corriente-voltaje (I-V) (-100 a +100 mV) para demostrar el potencial inverso de los canales activados. Este resultado se comparará con datos obtenidos en HLMVEC en las que IP3R3 se agotará con siRNA o se inhibirá con el antagonista de IP3R, borato de 2-aminoetoxidifenilo (2-APB). Otros experimentos complementarios abordarán si la inactivación separada o simultánea de TRPC1 y TRPC4 con un Ab específico o con siRNA producirá el efecto similar sobre la conductancia en células enteras en comparación con el agotamiento de EB3. Sobre la validez de la hipótesis de los presentes solicitantes, se predice que el agotamiento de EB3 inhibirá la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales de TRPC1/4. Estos experimentos irán acompañados de medidas de cambios en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular por formación de imágenes radiométricas con Fura2-AM.

Otra serie de experimentos determinará si el agotamiento de EB3 puede inhibir la activación de SOC y la entrada de Ca<sup>2+</sup> inducida por taspigargina (TG) o IP3 (liberación intracelular por microinyección). TG inhibe la Ca<sup>2+</sup> ATPasa del retículo sarco/endoplásmico y ocasiona el agotamiento de Ca<sup>2+</sup> desde el RE independientemente de la activación

por IP3R. Es de esperar que los dos enfoques induzcan la activación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> provocada por SOC en células tratadas con siRNA de control, sin embargo, el agotamiento de EB3 podría inhibir la entrada de Ca<sup>2+</sup> solo en el caso de activación de IP3R inducida por IP3. Estos experimentos distinguirán entre la implicación de EB3 en la regulación de la entrada de Ca<sup>2+</sup> provocada por SOC indirectamente, mediante la activación de IP3R y, directamente, si EB3 (o el cambio dinámico de MT) tiene algún efecto sobre la activación del canal SOC per se. Los presentes solicitantes evaluarán la conductancia en células enteras y la relación de corriente-voltaje (I-V) para demostrar la actividad de canales de TRPC1/4 en estos experimentos.

### Ejemplo 9

#### **Papel de la interacción de EB3 con IP3R en el mecanismo de aumento de la permeabilidad endotelial y formación de edema.**

Los presentes solicitantes determinarán si la interacción entre EB3 e IP3R que tiene como resultado la propagación de la señalización de Ca<sup>2+</sup> potencia la respuesta de aumento de la permeabilidad a la activación de PAR-1. En este contexto, los presentes solicitantes abordarán el aumento de la barrera de permeabilidad en células y en pulmones tratados con péptidos bloqueantes de IP3R. Los presentes solicitantes evaluarán el aumento de permeabilidad endotelial midiendo cambios en TER y en flujos de albúmina transendoteliales como medidas funcionales de alteraciones de la barrera endotelial. La integridad de las AJ (uniones adherentes) y la formación de huecos intracelulares se determinarán por inmunotinción, por análisis cuantitativo de internalización de cadherina VE (usando un ensayo de biotilación), por interacción entre cadherina VE y p120-catenina. Basándose en la validez de la hipótesis de los presentes solicitantes, es de esperar que la inhibición del aumento en la concentración de Ca<sup>2+</sup> intracelular dé como resultado una respuesta de permeabilidad reducida reflejada por una menor formación de huecos intracelulares y adhesiones de cadherina VE más estables. Como el aumento de Ca<sup>2+</sup> intracelular activa la PKC $\alpha$ , que media la disociación de las AJ por fosforilación de la p120-catenina, los presentes solicitantes determinarán el nivel de activación de PKC $\alpha$  y el nivel de fosforilación de p120-catenina en el sitio específico de PKC $\alpha$ , Ser879. Para determinar si la contractilidad celular mediada por PAR-1 también se inhibe en células con EB3 agotado o en células pretratadas con péptido IP3R3, los presentes solicitantes analizarán el nivel de activación de RhoA y MLCK-L. Para la comparación, se usarán las células con agotamiento de IP3R3 o las células endoteliales microvasculares de pulmón aisladas de ratones IP3R3<sup>-/-</sup> 37.

Para determinar si la interacción entre EB3 e IP3R potencia el aumento inducido por agonista en la permeabilidad microvascular y el edema pulmonar, los presentes solicitantes usarán el modelo pulmonar *ex vivo*. Se usará la preparación pulmonar perfundida de ratón para determinar si el péptido IP3R, al que es permeable la célula, inhibe el aumento mediado por PAR-1 de la permeabilidad vascular del pulmón. La permeabilidad microvascular endotelial se evaluará midiendo el coeficiente de filtración capilar ( $K_{fc}$ ) y el flujo de 125I-albúmina transvascular pulmonar después de la infusión del péptido agonista de PAR1. Los presentes solicitantes también usarán ratones IP3R3<sup>-/-</sup> (obtenidos en Katsuhiko Mikoshiba, Japón) o ratones en los que IP3R3 se agotará por siRNA para verificar los resultados obtenidos con un péptido. Si la hipótesis de los presentes solicitantes de que la interacción entre IP3R y EB3 es esencial para regular el aumento inducido por agonista en la permeabilidad microvascular del pulmón, es de esperar que tanto el péptido IP3R como IP3R3<sup>-/-</sup> produzcan resultados comparables revelando una inhibición parcial del aumento de la permeabilidad microvascular en respuesta a la activación de PAR-1.

El objetivo de estos estudios es determinar el papel de EB3 en la regulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3 desde los depósitos del RE. Los presentes solicitantes determinarán el significado de la interacción entre EB3 e IP3R en el mecanismo de fosforilación de IP3R y la translocación del RE al plasmalema apical. Basándose en las hipótesis de los presentes solicitantes, se prevé que la interacción entre EB3 e IP3R proporcione un punto de control de activación de IP3R. Basándose en la validez de la hipótesis de los presentes solicitantes, se prevé que la alteración de la interacción de EB3 con IP3R inhiba la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los depósitos del RE y anule el aumento de respuesta de permeabilidad en cultivos celulares y en pulmones. Los presentes solicitantes examinarán los siguientes modelos mecanísticos de que la interacción EB3/IP3R regula la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3 1) mediante anclaje de IP3R3 a las caveolas, muy cerca de la generación de IP3 y 2) facilitando la fosforilación de IP3R3 por CaMKII. De esta manera, los experimentos en cultivo celular, junto con los estudios de microvasos pulmonares, identificarán el mecanismo por el cual EB3 regula la actividad de IP3R3. Los presentes solicitantes no prevén problemas en cuanto a la posibilidad de extraer nuevas conclusiones de estos estudios basándose en el ensayo de las hipótesis. Todas las técnicas propuestas se establecen en el laboratorio de los presentes solicitantes o en laboratorios de coinvestigadores y, por lo tanto, son factibles.

El citoesqueleto de MT juega un papel importante en el mantenimiento de la barrera endotelial en células en reposo y proporciona el mecanismo para potenciar el aumento de la permeabilidad endotelial mediado por estímulos proinflamatorios. EB3, una proteína de unión al extremo de los MT, regula la dinámica de los MT al promover un crecimiento persistente de MT y, por lo tanto, la actividad anticatástrofe de EB3 podría ser un mecanismo primario que controle la reorganización del citoesqueleto de MT y la pérdida de función de barrera endotelial durante enfermedades inflamatorias tales como lesión pulmonar aguda (ALI) y síndrome de dificultad respiratoria en adultos (ARDS). Los estudios propuestos abordarán los papeles de EB3 en la regulación de la liberación de Ca<sup>2+</sup> activada por IP3 desde depósitos del RE en respuesta a la activación de PAR-1 en el mecanismo de permeabilidad vascular

endotelial aumentada y formación de edema. Los presentes solicitantes definirán la interacción potencialmente importante entre EB3 e IP3R3 en el mecanismo de organización y propagación de ondas de Ca<sup>2+</sup> que participa en el aumento de la permeabilidad endotelial a través de una disociación de AJ mediada por PKC $\alpha$  y la contractilidad de acto-miosina dirigida por RhoA/MLCK-L.

5

### Ejemplo 10

#### Efecto del truncamiento del péptido IP3R3 sobre la unión a EB3

10 Se usó un modelado computacional *in silico* para estimar la contribución energética a la energía libre de unión proporcionada por cada resto en el péptido KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1). Una variante truncada de la secuencia de aminoácidos: KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1) se acopló en la interfaz de EB3 y se calculó la energía libre de la interacción (Tabla 1). Los datos demuestran que Thr-x-Ile-Pro tiene la menor energía de unión y que los aminoácidos flanqueantes juegan un papel crítico en la estabilización de la interacción entre EB3 y el péptido.

15

Tabla 1. Cambios calculados en la energía libre de unión después del truncamiento de restos de aminoácidos con el motivo Thr-x-Ile-Pro circundante del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>

Secuencia del Péptido	Energía Libre de Unión (-kcal/mol)
<b>KFARLWTEIPTAIT (péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>)</b>	<b>-68,882</b>
FARLWTEIPTAIT	-68,809
RLWTEIPTAIT	-46,571
LWTEIPTAIT	-54,443
WTEIPTAIT	-42,886
TEIPTAIT	-37,16
TEIPTAI	-39,337
TEIPTA	-41,234
TEIPT	-34,5
FARLWTEIPTAI	-51,42
TEIP	-45,071
RTEIPTI	-49,74
FRTEIPTI	-40,728
FTKIPTI	-55,469
KFARTKIPTAIT	-57,32
FARTEIPTAI	-33,415
KFARTEIPTAIT	-55,736

20

### Ejemplo 11

#### Diseño basado en la estructura del péptido inhibidor de la unión al extremo (EBIN)

25 Se diseñó el péptido inhibidor de la unión al extremo, es decir EBIN, basándose en una exploración mediante alanina computacional *in silico* y el acoplamiento completamente flexible del péptido IPR en la cavidad de unión a EB (Tablas 2 y 3).

Se usó la energía libre de la unión ( $\Delta G$ ) para determinar una contribución de cada resto a la estabilización de la interacción del péptido con la proteína EB.

30 Se usaron los siguientes criterios:

Valor de  $\Delta G \geq 1$  = Resto estabilizador  
 Valor de  $\Delta G \geq -1$  = Resto desestabilizador  
 Valor de  $\Delta G \leq -1$  a  $0$  a  $<1$  = Resto neutro

- 5 La exploración mediante alanina revela restos de estabilización (con una energía de unión positiva de 0,50 KJ/mol o mayor; mostrada en negro) y de desestabilización (con una energía de unión negativa de -1, mostrada en azul).

Tabla 2. Cambios calculados en la energía libre de unión después de la mutación de cada resto de aminoácido del péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> por alanina: **K<sub>1</sub>F<sub>2</sub>A<sub>3</sub>R<sub>4</sub>L<sub>5</sub>W<sub>6</sub>T<sub>7</sub>E<sub>8</sub>I<sub>9</sub>P<sub>10</sub>T<sub>11</sub>A<sub>12</sub>I<sub>13</sub>T<sub>14</sub>**

10

Aminoácido	$\Delta G$
K1	0,25
F2	<b>0,52</b>
R4	0,01
L5	-1,03
W6	-1,08
<b>T11</b>	<b>0,91</b>
<b>I13</b>	<b>1,33</b>
T14	0,40

Tabla 3. Cambios calculados en la energía libre de unión después de mutar cada resto de aminoácido de EBIN por alanina.

Aminoácido	$\Delta G$
F1	1,64
T2	1,07
E3	0,02
14	0,68
T11	0,98
17	0,94

15

Como resultado, el péptido IPR de 14 aminoácidos se redujo al péptido inhibidor de unión al extremo de 7 aminoácidos (EBIN, FTEIPTI, SEQ ID NO: 3). La Figura 12 demuestra la interacción entre EB3 y EBIN. De forma similar a IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (se muestra como varilla amarilla en la Figura 12), EBIN se une al surco hidrófobo entre la cola ácida de EB y el dominio superenrollado. La unión de energía calculada de EBIN a EB3 es -60,251 kcal/mol, que es similar a la energía de unión entre IPR y EB3. La treonina en la posición 2 de EBIN juega un papel crítico en la unión a la interfaz de EB3 porque la mutación de este resto a alanina anula completamente la unión. Por lo tanto, se usó un péptido con mutación de un solo aminoácido T → A, FAEIPTI (SEQ ID NO: 4) como control de pérdida de unión.

20

### Ejemplo 12

25

#### **EBIN inhibe la interacción de EB3/IP3R3 y atenúa el flujo de calcio intracelular en respuesta a mediadores proinflamatorios**

30

Para determinar las propiedades inhibitoras de EBIN en las células, se expusieron monocapas de células endoteliales de aorta pulmonar humana (HPAEC) pretratadas con EBIN o con un péptido de control a la concentración de 1  $\mu$ M con trombina. La interacción entre EB3 y el receptor IP3R3 se analizó usando un análisis de Transferencia de Western. Como se demuestra en la Figura 13, el tratamiento con EBIN atenuó la interacción basal e inducida por trombina entre EB3 e IP3R3. De forma coherente con la idea del papel de EB3 en la modulación de la



capacidad de respuesta de IP3R3 a IP3, EBIN inhibió significativamente el flujo de calcio intracelular en respuesta a trombina e histamina. La Figura 14 demuestra cambios en la relación 340/380 (Fura-2M unido/libre) en HPAEC pretratadas con Myr-EBIN 1  $\mu$ M o el péptido de control (FAEIPTI) y la exposición con trombina 50 nM o histamina 90  $\mu$ M. EBIN, pero no el péptido de control mitigaban el aumento inducido por agonista en el calcio intracelular. [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> cambia después de la estimulación de monocapas de HPAEC con citocinas proinflamatorias.

Para determinar el efecto de EBIN sobre el cambio de forma celular y la permeabilidad paracelular, se midió la resistencia transendotelial de monocapas de HPAEC. La Figura 15 demuestra que EBIN, pero no con un péptido de pérdida de unión, inhibía el cambio de forma celular y la hiperpermeabilidad paracelular de monocapas de HPAEC en respuesta a los dos mediadores proinflamatorios. Estos resultados demuestran que el efecto protector de la barrera de EBIN está asociado con la inhibición de la señalización del calcio y el cambio de la forma celular del endotelio.

### Ejemplo 13

#### EBIN inhibe la producción de NO y la vasodilatación inducida por histamina en ratones.

La actividad óxido nítrico sintasa 3 (eNOS), una enzima específica del endotelio que produce NO, está regulada por la señalización de calcio, particularmente, mediante la interacción de eNOS con calmodulina, y es una causa conocida de hiperpermeabilidad de la barrera endotelial durante la inflamación. Como EBIN inhibe la señalización de calcio, se postuló que el efecto protector de la barrera de EBIN, en parte, se debe a la inhibición de eNOS. Por lo tanto, se midió el efecto de EBIN sobre la producción basal e inducida por agonista de NO. La formación de NO se midió usando electrodos de NO porfirínicos acoplados a un FAS1 Femtostat y a un ordenador personal con software electroquímico (Gamry Instruments). La corriente del electrodo, que es proporcional a la concentración de NO, se midió en función del tiempo. De manera interesante, EBIN no mostró ningún efecto sobre la producción basal de NO, lo que sugiere que no inhibe la actividad eNOS constitutiva. Sin embargo, EBIN atenúa significativamente la producción de NO inducida por agonista (Figura 16). De forma coherente con estos resultados, la inyección i.v. de AP-EBIN en ratones no mostró ningún efecto sobre la presión sanguínea sistólica, sin embargo, EBIN inhibía significativamente la vasodilatación inducida por histamina (Figura 17). Estos datos están de acuerdo con datos obtenidos en experimentos de cultivo celular. Estos resultados demuestran que EBIN atenúa la vasodilatación mediante la inhibición de la generación de NO en respuesta a la histamina.

### Ejemplo 14

#### EBIN previene la letalidad en septicemia inducida por LPS y la extravasación vascular después de una anafilaxis.

Se determinó el efecto de EBIN sobre la tasa de mortalidad por septicemia inducida por LPS. Los ratones recibieron inyección retroorbital i.v. de AP-EBIN o péptido de control AP, 30 minutos antes y 1 hora después de la administración de LPS a una dosis DL90. Los ratones tratados con EBIN demostraron una notable mejoría en la tasa de supervivencia de los grupos de control (Figura 18). Además, se determinó si el tratamiento posterior de EBIN también muestra algún efecto protector. En este experimento, se inyectó Myr-EBIN en la vena de la cola 30 min y 24 h después de la exposición a LPS. Como se muestra en la Figura 19, el tratamiento posterior con EBIN produjo una mejoría insignificante en la tasa de supervivencia en comparación con el grupo de control (péptido de pérdida de unión). Consecuentemente con los resultados previos con Ap-EBIN, el pretratamiento con Myr-EBIN demostró un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la tasa de supervivencia (Figura 19). Se concluye que la administración de EBIN antes de la inflamación sistémica tiene un resultado mucho más beneficioso.

La hiperpermeabilidad microvascular de las vías respiratorias, el resultado de una elevación de VEGF en plasma, es uno de los factores críticos que contribuyen a la función anómala de las vías respiratorias en pacientes con asma clásica y su variante con tos. Como la respuesta asmática alérgica aguda principalmente se debe a la hipersensibilidad mediada por IgE, también se determinó si EBIN protege de la extravasación vascular subcutánea después de una reacción *anafiláctica* mediada por IgE. La Figura 20 muestra que la inyección intravenosa de EBIN, pero no del péptido de pérdida de unión de control, atenúa significativamente la extravasación vascular subcutánea (tamaño e intensidad de área positiva a Azul de Evan) en la oreja (alta vascularización, A) y en el lomo (baja vascularización, B). Estos datos indican que EBIN podría usarse eficazmente para mejorar la función pulmonar y la salud general de pacientes con formas crónicas o agudas de asma alérgica, y reducir la respuesta inflamatoria asmática.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Board of Trustees of the University of Illinois  
Komarova, Yulia

<120> COMPOSICIONES PEPTÍDICAS Y MÉTODOS PARA TRATAR LESIÓN PULMONAR



**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un péptido aislado que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), un fragmento de los mismos, en donde el fragmento reduce la interacción entre la Proteína 3 de Unión al Extremo (EB3) y el Receptor de Inositol 1,4,5-trifosfato Tipo 3 (IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>).
- 10 2. El péptido de la reivindicación 1, en donde el péptido está unido a un péptido transportador.
3. El péptido de la reivindicación 2, en donde el péptido transportador es el péptido antennapedia (AP).
4. El péptido de la reivindicación 3, en donde el péptido está miristoilado.
- 15 5. Una formulación farmacéutica que comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable y el péptido de la reivindicación 1.
- 20 6. Un péptido aislado que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1) o un fragmento del mismo, para uso en el tratamiento de lesión pulmonar, síndromes de permeabilidad vascular sistémica, angioedema, anafilaxis o congestión nasal asociada con rinitis alérgica o no alérgica, en donde el péptido reduce la interacción entre EB3 e IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>.
7. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la lesión pulmonar es una extravasación vascular mediada por inflamación.
- 25 8. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la lesión pulmonar es asma, y en donde el asma es asma alérgica crónica o aguda.
- 30 9. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los síndromes de permeabilidad vascular sistémica se deben a endotoxemia.
10. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los síndromes de permeabilidad vascular sistémica se deben a traumatismos.
- 35 11. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los síndromes de permeabilidad vascular sistémica se deben a transfusiones múltiples.
12. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde los síndromes de permeabilidad vascular sistémica se producen como un efecto secundario de un tratamiento con fármaco.
- 40 13. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 12, en donde el tratamiento con fármaco es el uso sistémico de IL-2 para tratar cánceres.
- 45 14. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la anafilaxis se selecciona del grupo que consiste en reacción anafilactoide inducida por alérgeno y no alérgica.
15. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la reacción anafilactoide no alérgica se debe a un colorante de contraste.

FIGURA 1

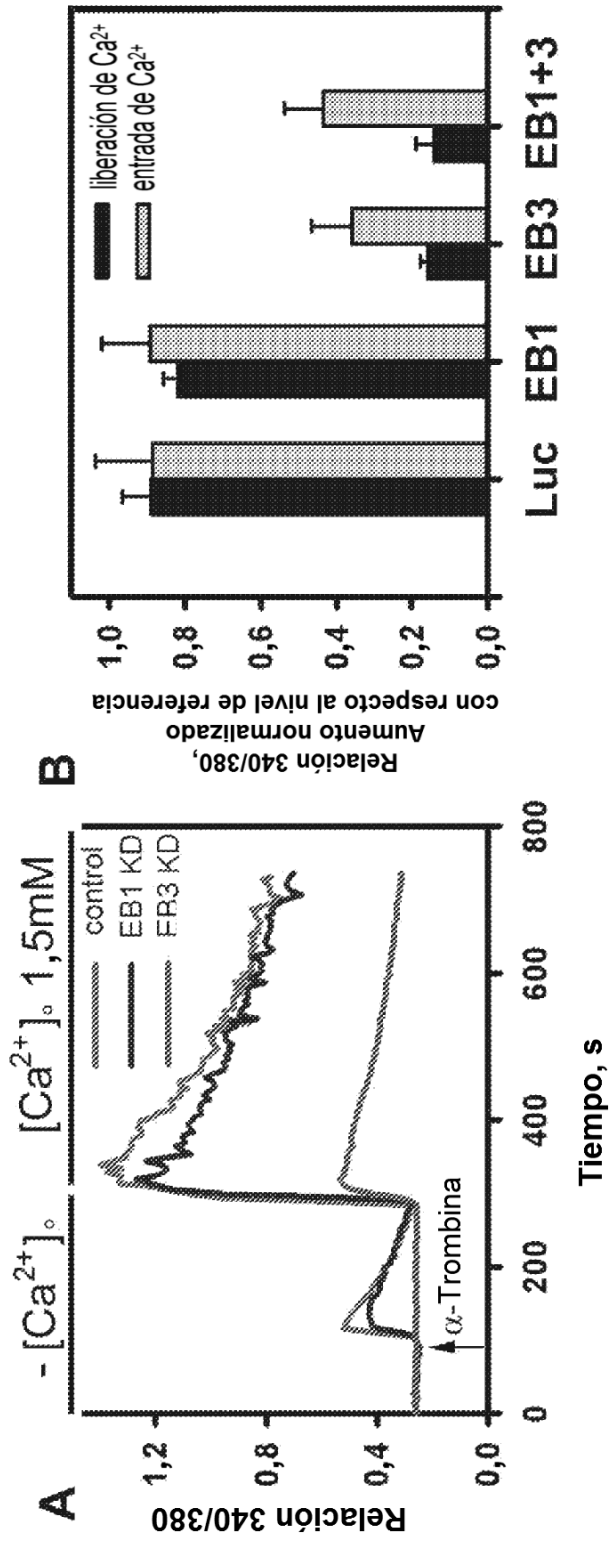


FIGURA 2

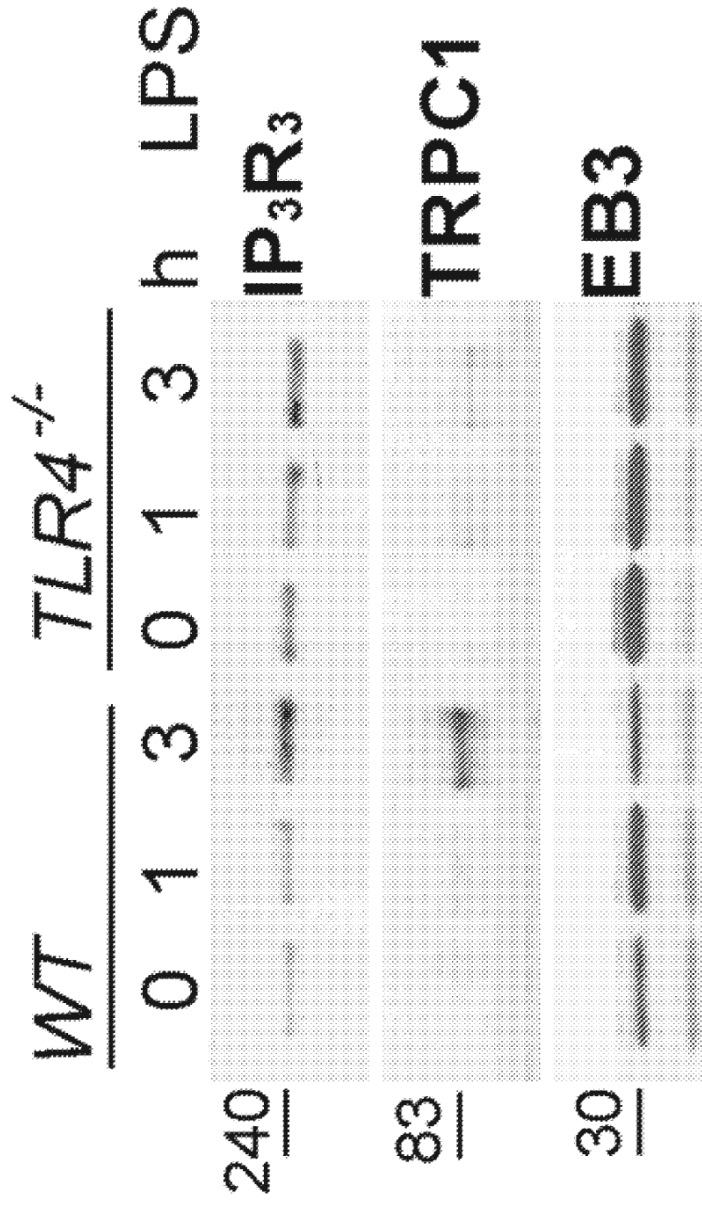


FIGURA 3

IP <sub>3</sub> R <sub>1</sub> i soforma1	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP <sub>3</sub> R <sub>1</sub> i soforma2	VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP <sub>3</sub> R <sub>2</sub>	VVPVRYARLWTEIIPTKITTHE
IP <sub>3</sub> R <sub>3</sub>	VTPVKFARLWTEIIPTAITIKD
unión a EB	-----S/TxIP-----

SEQ ID NO: 1 péptido IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>      VEALWTEIIPTAITIKD

FIGURA 4

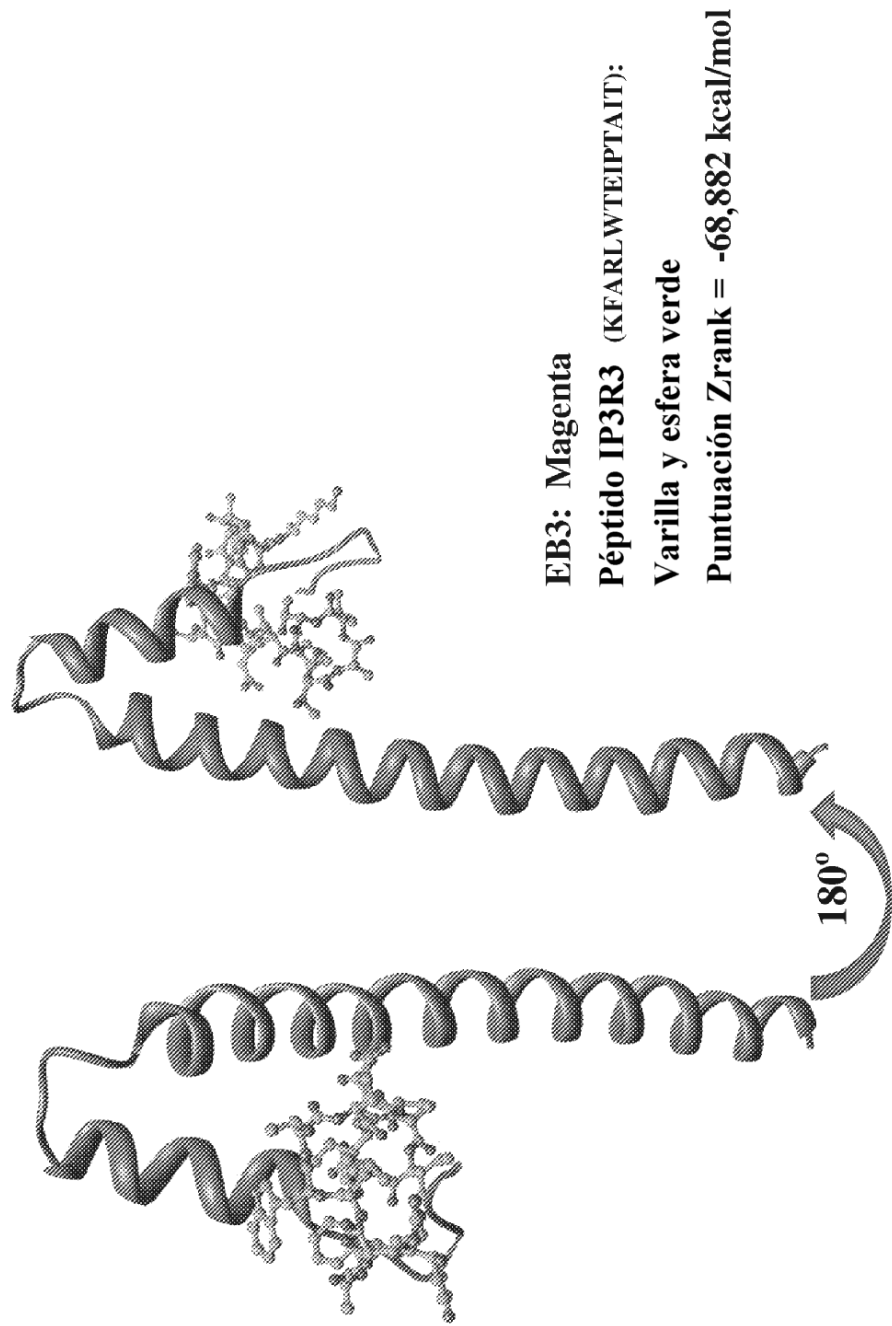


FIGURA 5

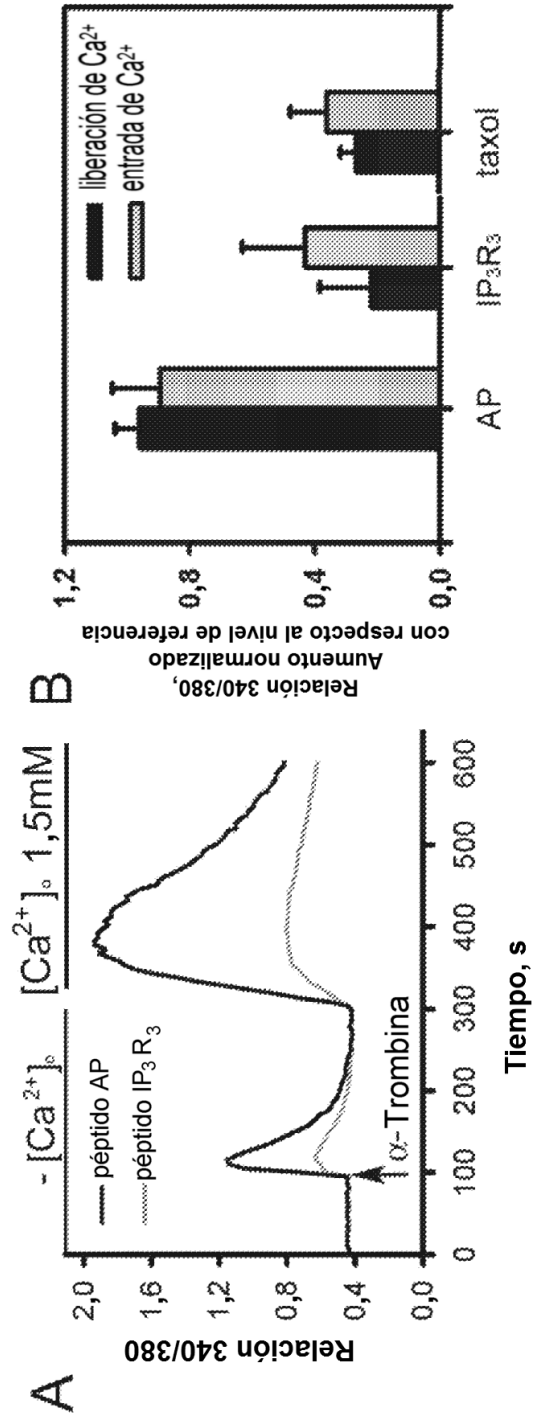




FIGURA 6

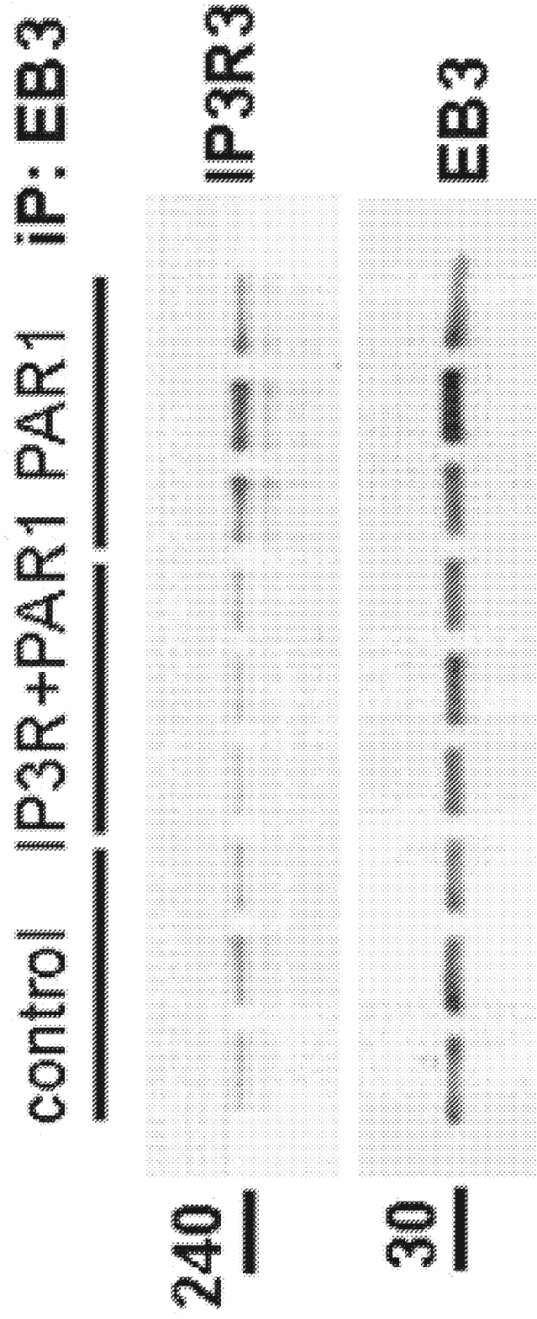


FIGURA 7

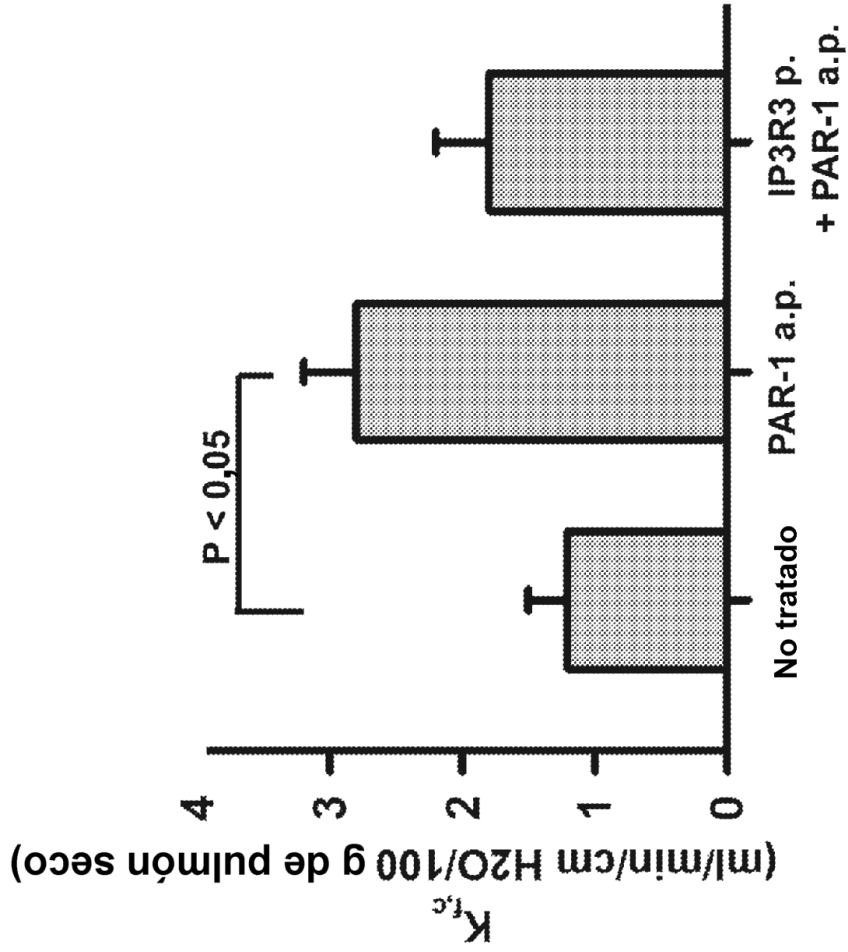


FIGURA 8

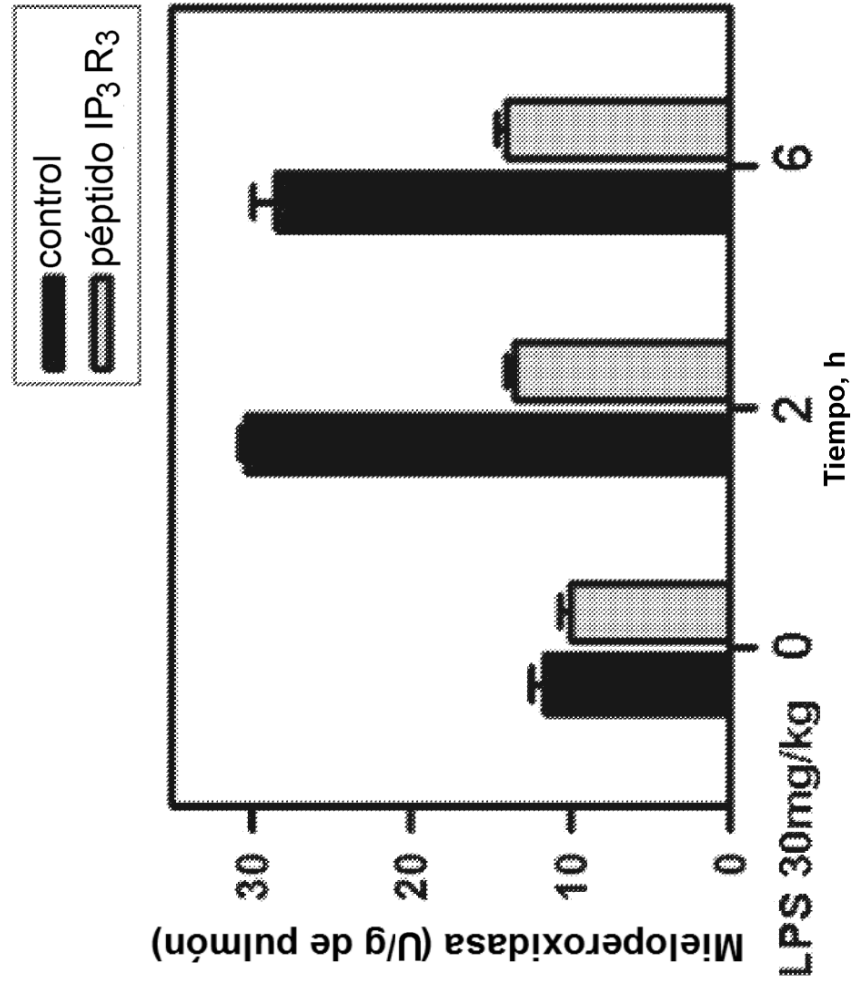
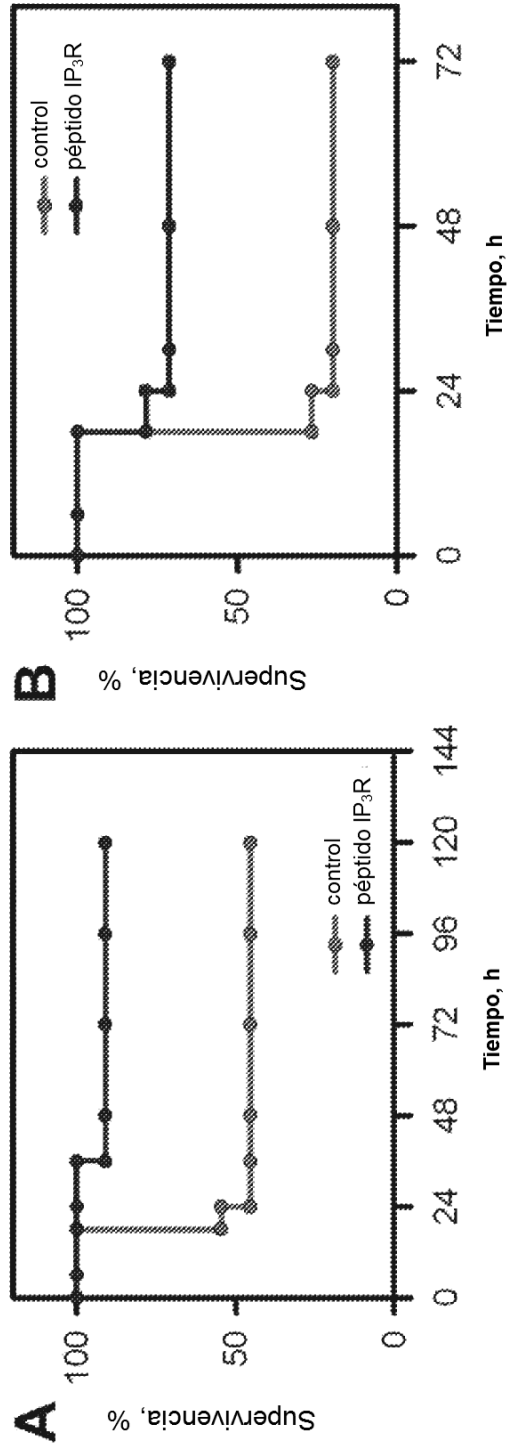


FIGURA 9



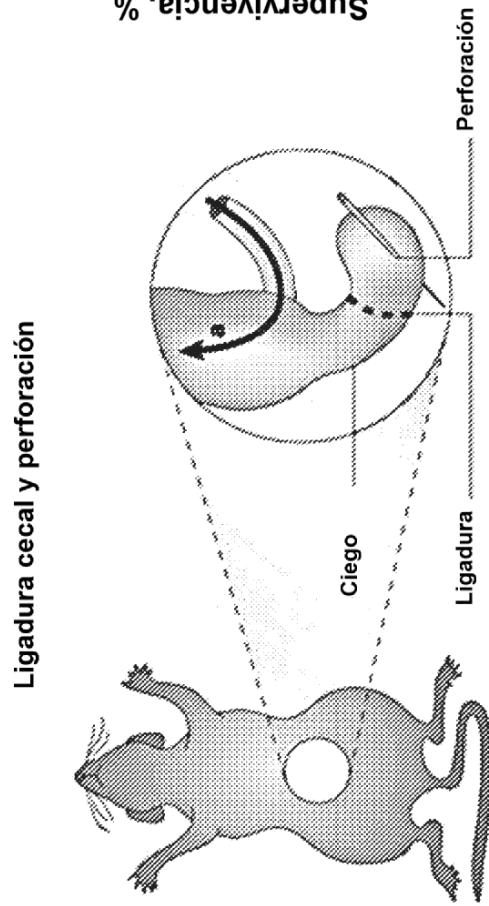


FIGURA 10

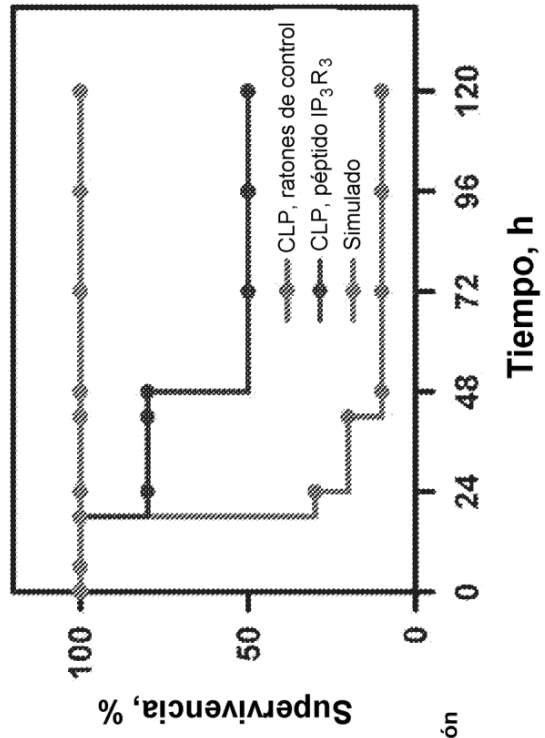


FIGURA 11

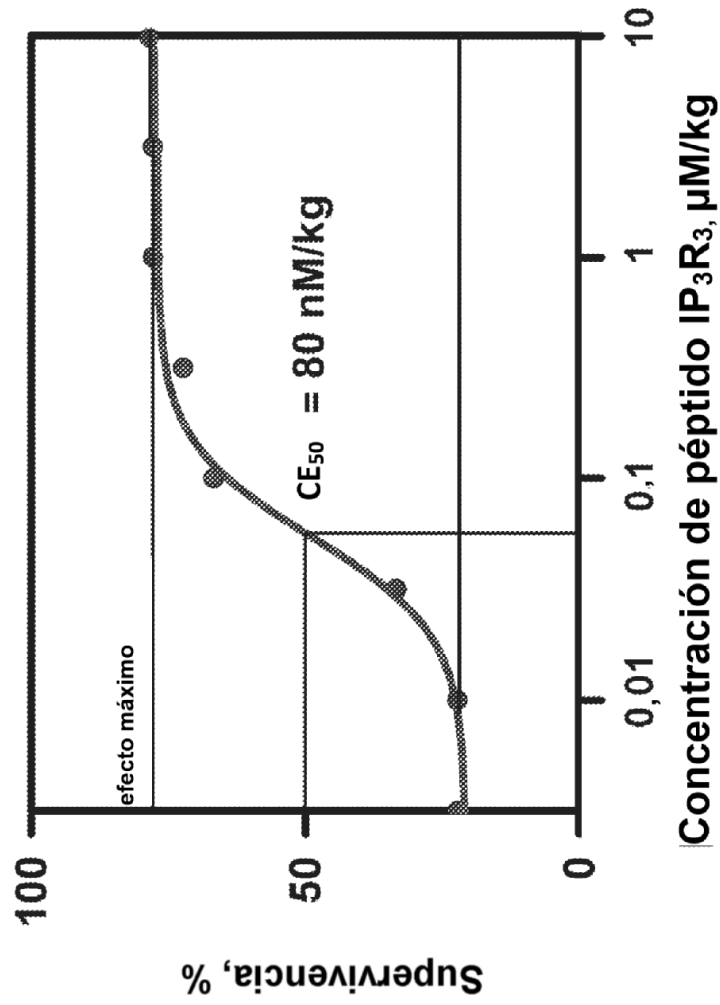


FIGURA 12

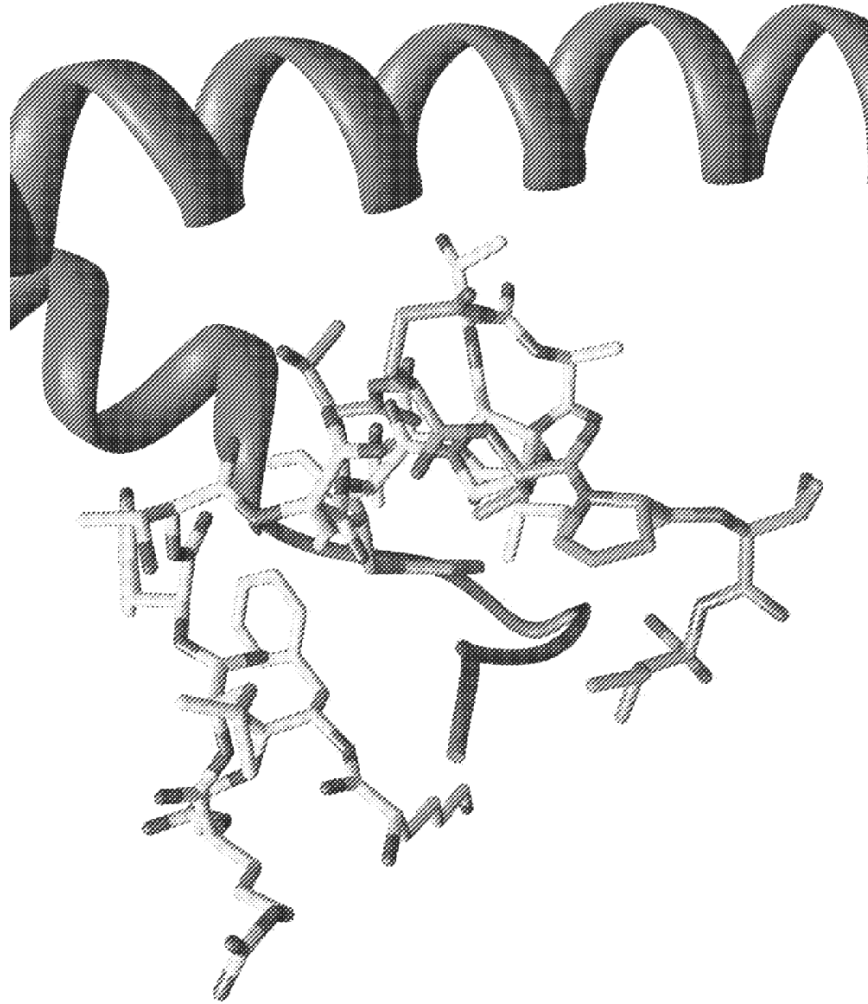


FIGURA 13

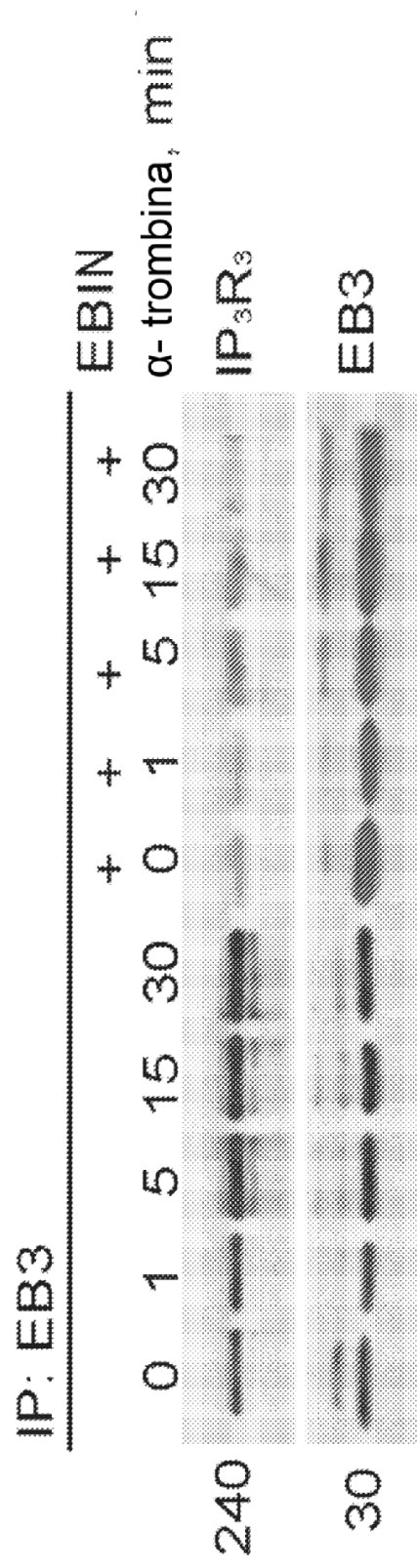




FIGURA 14

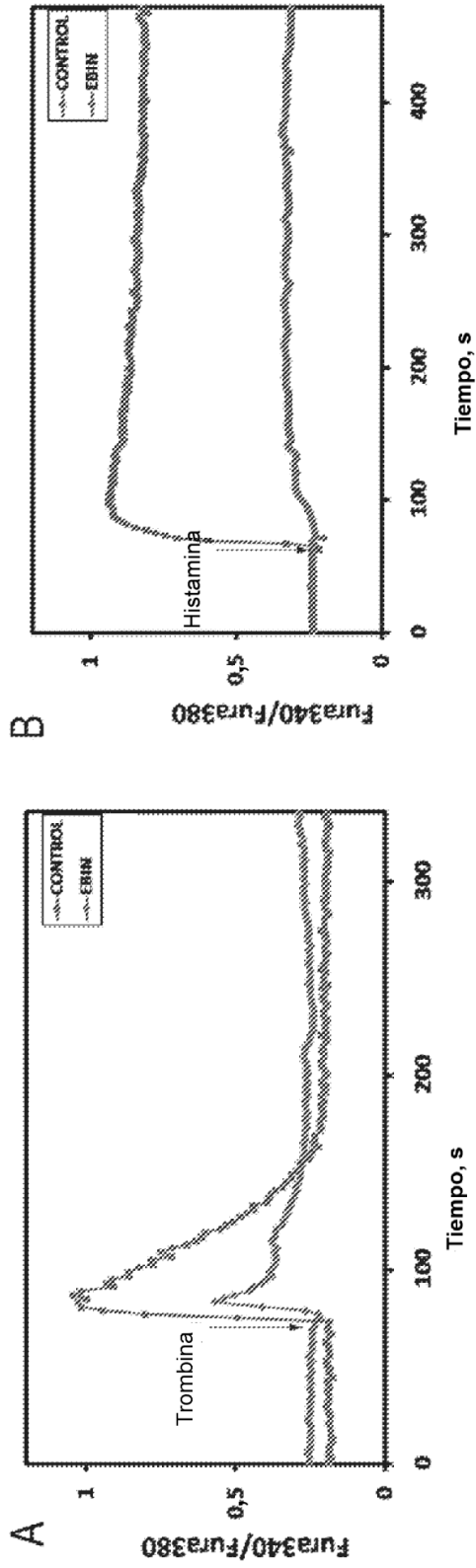


FIGURA 15

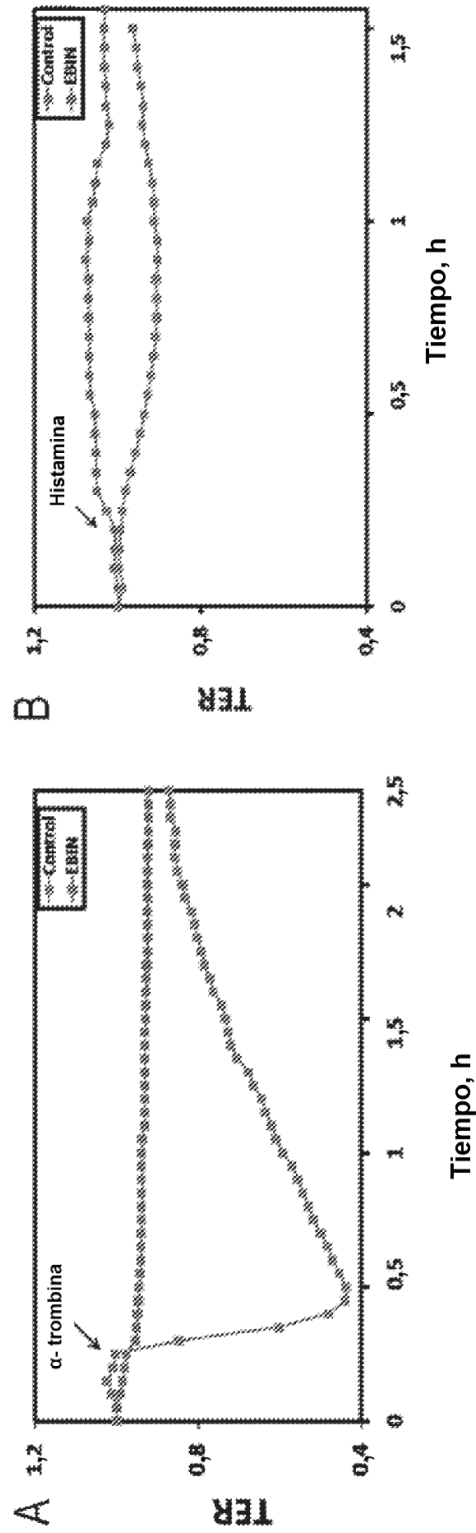
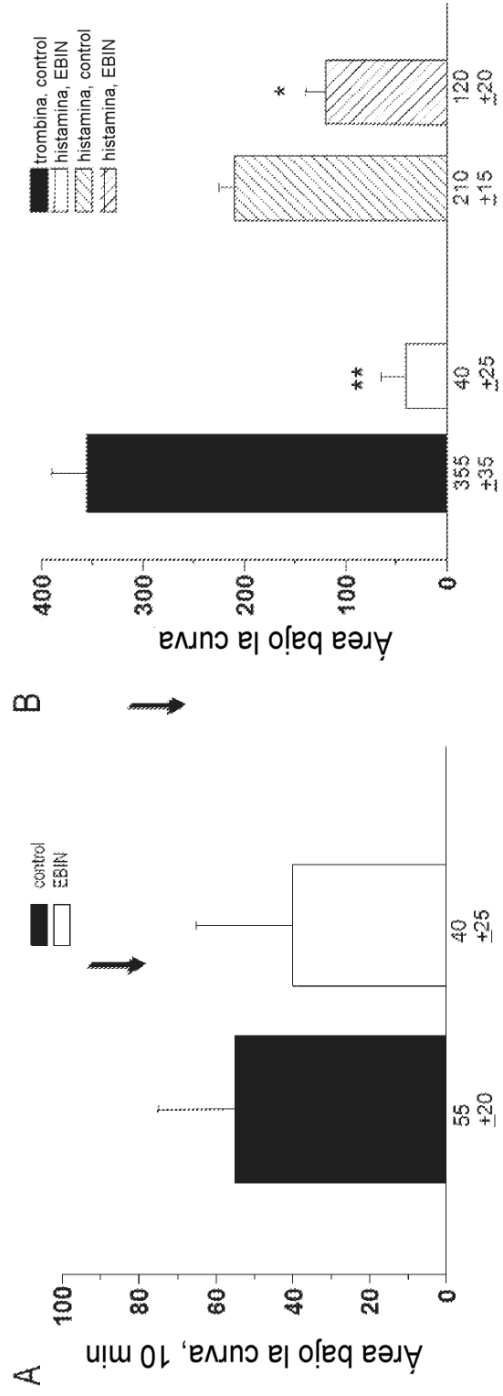


FIGURA 16



n = 2 animales/grupo

FIGURA 17

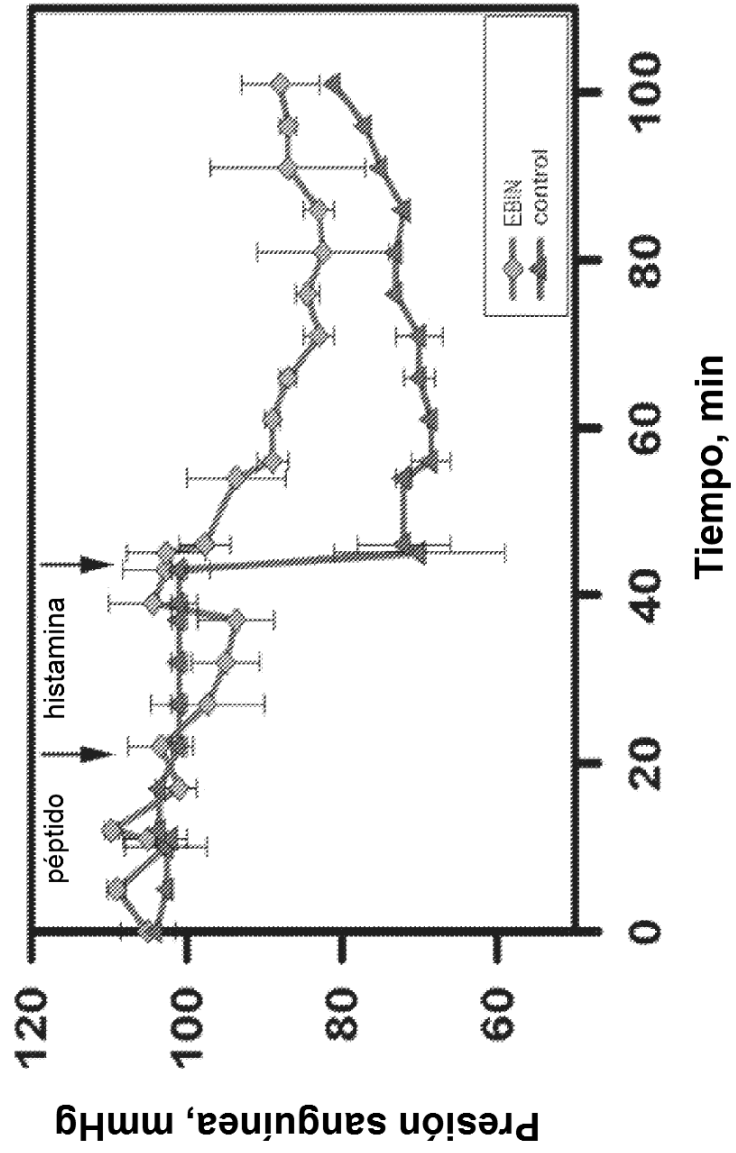
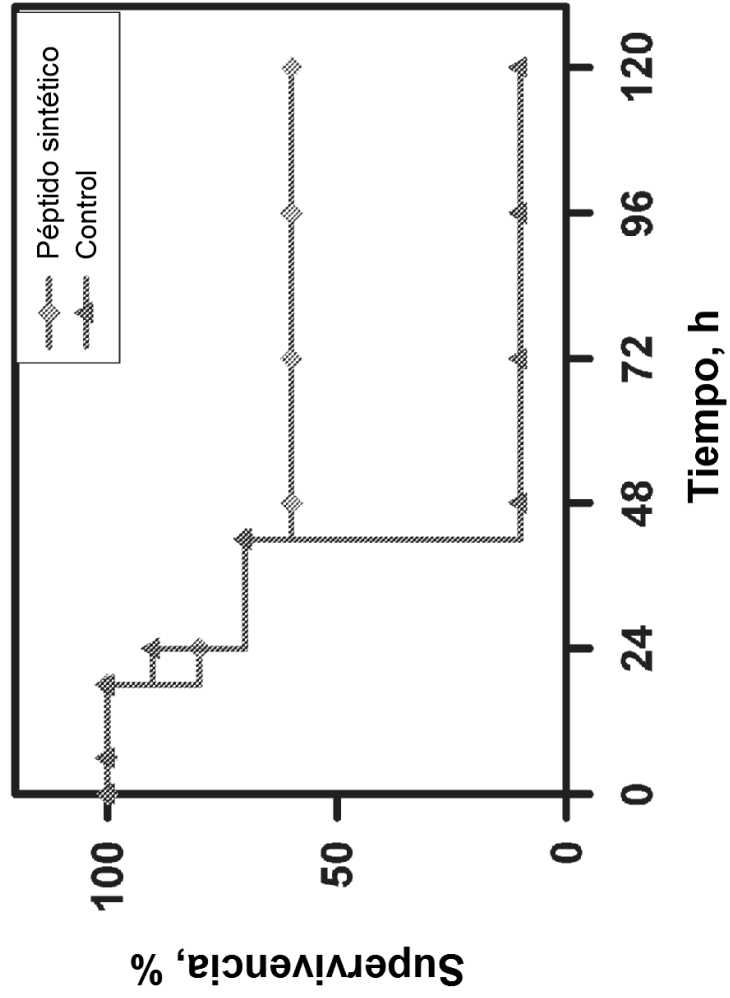


FIGURA 18



n = 10 animales/grupo

FIGURA 19

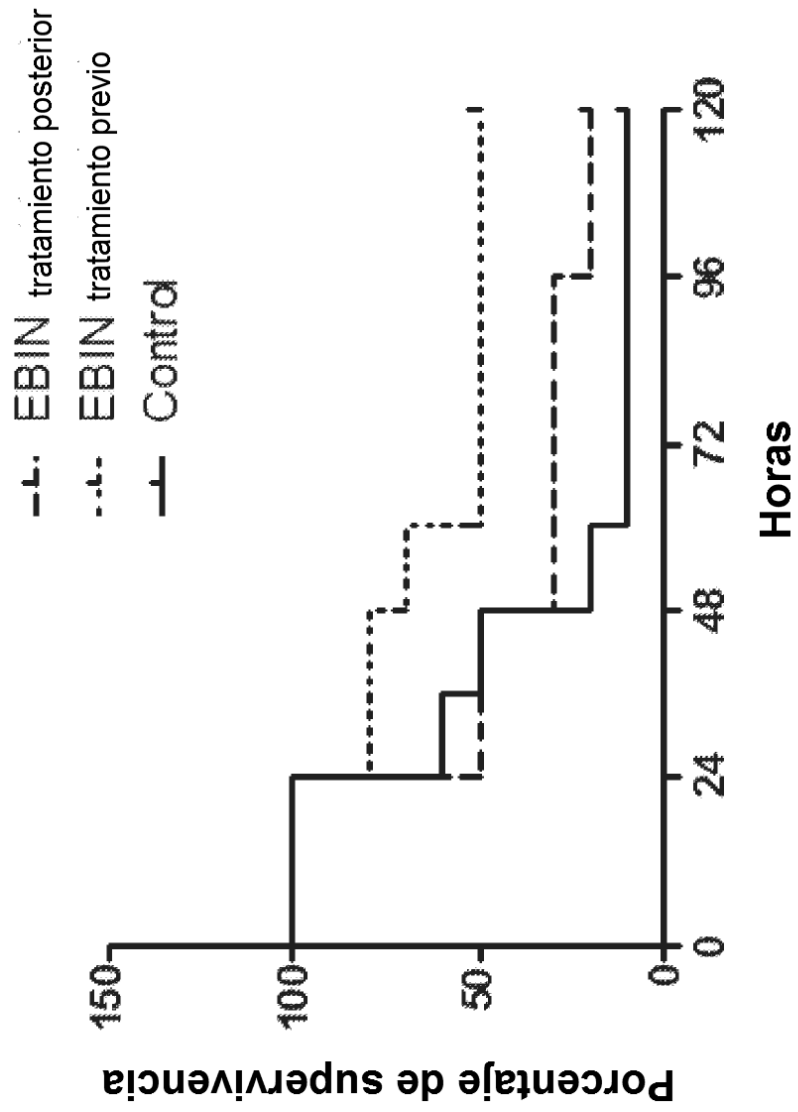


FIGURA 20

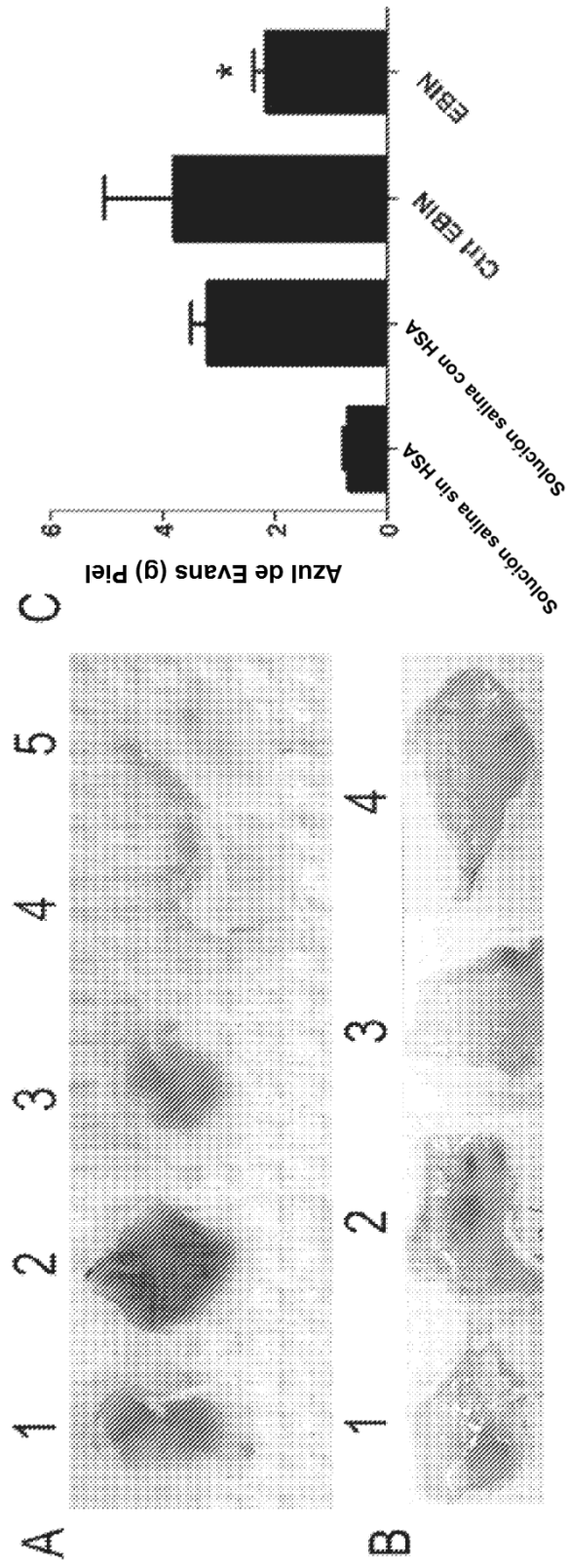


FIGURA 21

