



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 364 147**

51 Int. Cl.:
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 14/515 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05711471 .2**
96 Fecha de presentación : **14.01.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1709081**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.10.2006**

54 Título: **Polipéptidos de fusión capaces de activar receptores.**

30 Prioridad: **16.01.2004 US 536968 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.08.2011

73 Titular/es: **REGENERON PHARMACEUTICALS, Inc.**
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, New York 10591, US

72 Inventor/es: **Fandl, James;**
Chen, Gang;
Papadopoulos, Nicholas y
Aldrich, Thomas, H.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 364 147 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

Polipéptidos de fusión capaces de activar receptores

Campo de la Invención

5 Esta invención se refiere a proteínas de fusión multiméricas capaces de activar un receptor Tie diana, a los métodos para producir tales polipéptidos de fusión, y a los métodos para tratar, diagnosticar, o controlar enfermedades o afecciones en las cuales se desea la activación del receptor diana.

Descripción de la Técnica Relacionada

10 La agrupación de dominios del ligando Eph soluble para crear multímeros capaces de activar sus receptores cognados se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.747.033. La Patente de los Estados Unidos Núm. 6.319.499 cita un método de activación de un receptor de eritropoyetina con un anticuerpo. Davis et al. (Nature Structural Biology, Vol. 10, Núm. 1, Enero 2003) describen multímeros de angiopoyetina, que es un ligando del receptor Tie 2, junto con un fragmento Fc de un componente multimerizante. En el documento WO 01/90192 se describe un anticuerpo biespecífico, siendo cada anticuerpo específico para un receptor diana (Tek o Tie-2).

BREVE RESUMEN DE LA INVENCION

15 La presente invención proporciona polipéptidos de fusión multiméricos capaces de activar un receptor Tie diana que requiere la multimerización para ser activado. Los polipéptidos de la invención son útiles por tratar afecciones en las que es deseable la activación de un receptor diana, así como por tener una variedad de usos diagnósticos y pronósticos *in vitro* e *in vivo*. Los polipéptidos de la invención pueden ser tetrámeros mono-específicos o biespecíficos que muestran una capacidad mejorada para activar un receptor diana, por ejemplo, con respecto a, un anticuerpo específico de la diana o al ligando natural.

20

Por consiguiente, la invención proporciona un polipéptido de fusión que comprende $(A)_x\text{-M-(A')}_y$, donde A es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un receptor Tie diana, A' es un dominio de fibrinógeno de un ligando del receptor Tie o uno de sus fragmentos y es capaz de unirse al mismo receptor diana, M es un componente multimerizante, y X e Y son independientemente un número entre 1 y 10; y donde el polipéptido de fusión activa el receptor Tie diana induciendo la fosforilación de dicho receptor al unirse a él.

25

En una realización preferida, M es el dominio Fc de la IgG o la cadena pesada de la IgG. El dominio Fc de la IgG se puede seleccionar a partir de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, así como cualquier alotipo de cada grupo de isotipos.

30 En un aspecto adicional, la invención proporciona un polipéptido de fusión dimérico activador que comprende dos polipéptidos de fusión de la invención, p. ej., un dímero formado a partir de dos polipéptidos de $(A)_x\text{-M-(A')}_y$ como se ha definido antes. Los dímeros activadores de la invención son capaces de unir y agrupar cuatro o más receptores, conduciendo a la activación del receptor, en comparación con la capacidad de un anticuerpo para agrupar no más de dos receptores.

35 En una realización, los componentes de los polipéptidos de fusión de la invención están conectados directamente entre sí. En otras realizaciones, se puede incluir una secuencia espaciadora entre uno o más componentes, que pueden comprender una o más moléculas, tales como aminoácidos. Por ejemplo, una secuencia espaciadora puede incluir uno o más aminoácidos conectados naturalmente a un componente que contiene un dominio. Una secuencia espaciadora también puede incluir una secuencia utilizada para intensificar la expresión del polipéptido de fusión, proporcionar sitios de restricción, permitir que los dominios del componente formen estructuras terciarias y cuaternarias óptimas y/o intensifiquen la interacción de un componente con su receptor diana. En una realización, el polipéptido de fusión de la invención comprende una o más secuencias de péptidos entre uno o más componentes que tiene (tienen) entre 1 y 25 aminoácidos. Otras realizaciones pueden incluir una secuencia señal al principio o en el extremo amino de un polipéptido de fusión de la invención. Dicha secuencia señal puede ser nativa con respecto a la célula, recombinante, o sintética.

40

45 Los componentes del polipéptido de fusión de la invención se pueden disponer en una variedad de configuraciones. Por ejemplo, descritas desde el comienzo o el extremo amino del polipéptido de fusión, $(A)_x\text{-M-(A')}_y$, $(A)_x\text{-(A')}_y\text{-M}$, $\text{M-(A')}_y\text{-(A)}_x$, $(A')_y\text{-(A)}_x\text{-M}$, $\text{M-(A')}_y\text{-(A)}_x$, $(A)_x\text{-M-(A')}_y$, $(A)_x\text{-(A')}_y\text{-M}$, $\text{M-(A)}_x\text{-(A')}_y$, etc., donde X = 1-10 e Y = 1-10. En una realización aún más específica, X = 1, e Y = 1 o X = 2 e Y = 2.

50 En un aspecto adicional, la invención ofrece un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención. La invención ofrece adicionalmente un vector de expresión que comprende un ácido nucleico de la invención, donde la molécula de ácido nucleico está conectada operablemente a una secuencia de control de la expresión. También se proporciona un sistema anfitrión-vector para la producción de los polipéptidos de fusión de la invención que comprende el vector de expresión de la invención que ha sido introducido en una célula anfitriona aislada u organismo no humano, incluyendo, pero no limitado a, animales transgénicos no humanos, adecuados para la expresión de los polipéptidos de fusión.

55

En un aspecto adicional, la invención ofrece un método para producir un polipéptido de fusión de la invención, que comprende cultivar una célula anfitriona transfectada con un vector que comprende una secuencia de ácido nucleico de la invención, en condiciones adecuadas para la expresión del polipéptido a partir de la célula anfitriona, y recuperar el polipéptido de fusión producido de ese modo.

- 5 En un aspecto adicional, la invención también hace referencia a métodos terapéuticos para el tratamiento de una enfermedad o afección relacionada con el receptor diana, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un dímero activador de la invención a un sujeto que lo necesite, donde el receptor diana es activado, y la enfermedad o afección resulta aliviada o inhibida.

- 10 Por consiguiente, en un aspecto adicional, la invención ofrece composiciones farmacéuticas que comprenden un dímero activador de la invención con un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones farmacéuticas pueden comprender proteínas diméricas o ácidos nucleicos codificantes.

Otros objetos y ventajas serán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada subsiguiente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

- 15 Según se utiliza en la presente memoria, el término "afección o enfermedad relacionada con un receptor diana" incluye generalmente una afección de un anfitrión mamífero, concretamente un anfitrión humano, que está asociado con un receptor diana concreto. De este modo, el tratamiento de una afección relacionada con un receptor diana incluirá el tratamiento de un mamífero, en particular, un ser humano, que tiene síntomas que reflejan una disminución de la activación del receptor diana, o que se espera que tenga una disminución de estos niveles en respuesta a una enfermedad, afección o régimen de tratamiento. El tratamiento de una afección o enfermedad relacionada con un receptor diana incluye el tratamiento de un sujeto humano donde la intensificación de la activación de un receptor diana con un dímero activador de la invención da como resultado un alivio de un síntoma no deseable resultante de la afección o enfermedad relacionada con el receptor diana. Según se utiliza en la presente memoria, una "afección relacionada con un receptor diana" también incluye una afección en la cual es deseable alterar, transitoriamente o a largo plazo, la activación de un receptor diana concreto.
- 20
- 25

Receptores Diana

Los receptores diana de la presente memoria son los receptores Tie (p. ej. Tie-1 o Tie-2). Los ligandos adecuados o sus fragmentos incluyen el dominio fibrinógeno de una angiopoyetina (p. ej. angiopoyetina-1 (ang-1), ang-2, ang-3, y/o ang-4). Estos son activados cuando son multimerizados.

- 30 **Anticuerpos Específicos de Receptores Diana y Ligandos**

- Los dímeros activadores de la invención comprenden uno o más dominios de unión a inmunoglobulina aislados de anticuerpos generados contra un receptor diana seleccionado. El término "inmunoglobulina" o "anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria hace referencia a un polipéptido de mamífero, incluyendo ser humano, que comprende una región marco de un gen de inmunoglobulina o sus fragmentos que se une y reconoce un antígeno específicamente, que en el caso de la presente invención, es un receptor diana o una de sus porciones. Si el dímero activador pretendido se va a utilizar como agente terapéutico para mamíferos, las regiones de unión a la inmunoglobulina deben derivar de las correspondientes inmunoglobulinas de mamífero. Si el dímero activador está destinado a un uso no terapéutico, por ejemplo para el diagnóstico y para ELISA, las regiones de unión a la inmunoglobulina pueden derivar de mamíferos humanos o no humanos, por ejemplo ratones. Los genes de la inmunoglobulina humana o sus fragmentos génicos incluyen las regiones constantes kappa, lambda, alfa, gamma, delta, epsilon, y mu, así como la miriada de genes de la región variable de la inmunoglobulina. Las cadenas ligeras se clasifican como kappa o lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como gamma, mu, delta, o epsilon, que a su vez definen las clases de inmunoglobulinas, IgG, IgM, IgA, IgD, e IgE; respectivamente. En cada clase de IgG, existen diferentes isotipos (p. ej., IgG1, IgG2, etc.). Por lo general, la región de unión al antígeno de un anticuerpo será la más crítica en la determinación de la especificidad y la afinidad de la unión.
- 35
- 40
- 45

- Una unidad estructural de inmunoglobulina (anticuerpo) ilustrativa de una IgG humana, comprende un tetrámero. Cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas de polipéptidos idénticas, teniendo cada par una cadena ligera (aproximadamente 25 kD) y una cadena pesada (aproximadamente 50-70 kD). El extremo N de cada cadena define una región variable de aproximadamente 100-110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento del antígeno. Los términos "cadena ligera variable" (V_L) y cadena pesada variable (V_H) hacen referencia a estas cadenas ligeras y pesadas respectivamente.
- 50

- Los anticuerpos existen en forma de inmunoglobulinas intactas, o en forma de numerosos fragmentos bien caracterizados producidos mediante la digestión con diversas peptidasas, p. ej., $F(ab)_2$, Fab', etc. De este modo, los términos inmunoglobulina o anticuerpo, según se utilizan en la presente memoria, también incluyen fragmentos de anticuerpo producidos mediante modificación de anticuerpos completos, o aquellos sintetizados *de novo* utilizando metodologías de ADN recombinante (p. ej., Fv de cadena sencilla) (ScFv) o aquellos identificados utilizando las
- 55

genotecas de presentación en fagos (véase, por ejemplo, McCafferty et al. (1990) Nature 348: 552-554). Además, el componente del dominio de unión al receptor diana de los polipéptidos de fusión de la invención incluyen las regiones variables de las cadenas pesada (VH) o ligera (VL) de las inmunoglobulinas, así como sus porciones de unión al receptor diana. Los métodos para producir tales regiones variables son descritos por Reiter, et al. (1999) J. Mol. Biol. 290: 685-698.

Los métodos para preparar anticuerpos son conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Kohler & Milstein (1975) Nature 256: 495-497; Harlow & Lane (1988) Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY). Los genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de interés se pueden clonar a partir de una célula, p. ej., los genes que codifican un anticuerpo monoclonal se pueden clonar a partir de un hibridoma y utilizar para producir un anticuerpo monoclonal recombinante. Las genotecas de genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales también se pueden elaborar a partir de células de hibridoma o plasma. Las combinaciones al azar de los productos de la cadena pesada y ligera generan una gran reserva de anticuerpos con diferente especificidad antigénica. Las técnicas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla o anticuerpos recombinantes (Patente de los Estados Unidos Núm. 4.946.778; Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567) se pueden adaptar para producir anticuerpos utilizados en los polipéptidos de fusión, dímeros activadores y métodos de la presente invención. Asimismo, se pueden utilizar ratones transgénicos, u otros organismos tales como otros mamíferos, para expresar anticuerpos humanos o humanizados. Alternativamente, se puede utilizar la tecnología de presentación en fagos para identificar anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, tales como dominios variables, y fragmentos Fab heteroméricos que se unen específicamente a antígenos seleccionados. La presentación en fagos tiene un valor particular para aislar anticuerpos que se unen débilmente o fragmentos de los mismos de animales inmunizados que, cuando se combinan con otros aglutinantes débiles de acuerdo con la invención descritos en la presente memoria, crean dímeros activadores que se unen fuertemente.

El escrutinio y la selección de las inmunoglobulinas preferidas (anticuerpos) se pueden llevar a cabo mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. El escrutinio inicial para determinar la presencia de anticuerpos monoclonales específicos para un receptor diana se puede llevar a cabo por medio de la utilización de métodos basados en ELISA o presentación en fagos, por ejemplo. Preferiblemente se lleva a cabo un escrutinio secundario para identificar y seleccionar un anticuerpo monoclonal deseado para su uso en la construcción de los polipéptidos de fusión de la invención. El escrutinio secundario se puede llevar a cabo con cualquier método adecuado conocido en la técnica.

Construcción y Expresión del Ácido Nucleico

Se pueden producir los componentes individuales de los polipéptidos de fusión de la invención a partir de moléculas de ácido nucleico utilizando métodos de la biología molecular conocidos en la técnica. Las moléculas de ácido nucleico se insertan en un vector que es capaz de expresar los polipéptidos de fusión cuando son introducidos en una célula anfitriona apropiada. Las células anfitrionas apropiadas incluyen, pero no están limitadas a, células bacterianas, de levadura, de insecto, y de mamífero. Se puede utilizar cualquiera de los métodos conocidos por los expertos en la técnica para la inserción de fragmentos de ADN en un vector para construir vectores de expresión que codifiquen los polipéptidos de fusión de la invención bajo el control de señales de control transcripcional/traduccionales. Estos métodos pueden incluir técnicas de ADN recombinante *in vitro* y sintéticas y recombinaciones *in vivo* (Véase Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory; Current Protocols in Molecular Biology, Eds. Ausubel, et al., Greene Publ. Assoc., Wiley-Interscience, NY).

La expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención se puede regular por medio de una segunda secuencia de ácido nucleico de manera que la molécula sea expresada en un anfitrión transformado con la molécula de ADN recombinante. Por ejemplo, se puede controlar la expresión de las moléculas de ácido nucleico de la invención por medio de cualquier elemento promotor/intensificador conocido en la técnica.

Componentes derivados de inmunoglobulina. Los constructos de ácido nucleico incluyen regiones que codifican dominios de unión derivados de anticuerpos anti-receptores diana. En general, tales dominios de unión derivarán de las regiones variables de las cadenas V_H o V_L . Tras la identificación y selección de los anticuerpos que muestran las características de unión deseadas, las regiones variables de las cadenas pesadas y/o las cadenas ligeras de cada anticuerpo son aisladas, amplificadas, clonadas y secuenciadas. Se pueden realizar modificaciones en las secuencias de nucleótidos de V_H y V_L , incluyendo adiciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos y/o que portan sitios de restricción, delecciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos, o sustituciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos.

La invención abarca anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que son humanizados o quiméricos. Las formas "humanizadas" o quiméricas de los anticuerpos no humanos (p. ej., murinos) son inmunoglobulinas, cadenas de inmunoglobulinas o sus fragmentos (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de unión a antígenos de los anticuerpos) que contienen las secuencias mínimas requeridas para la unión al antígeno derivadas de inmunoglobulinas no humanas. Tienen la misma especificidad y afinidad de unión o similar que un anticuerpo de ratón u otro anticuerpo no humano que proporciona el material de partida para la construcción de un anticuerpo quimérico o humanizado. Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos cuyos genes de la cadena ligera y pesada han

sido construidos, por lo general mediante ingeniería genética, a partir de segmentos de genes de inmunoglobulina pertenecientes a diferentes especies. Por ejemplo, los segmentos variables (V) de los genes de un anticuerpo monoclonal de ratón se pueden unir a segmentos constantes (C) humanos, tales como IgG1 e IgG4. Se prefiere el isotipo IgG1 humano. Un anticuerpo quimérico típico es, de este modo, una proteína híbrida que consiste en V o el dominio de unión al antígeno de un anticuerpo de ratón y C o el dominio efector de un anticuerpo humano. Los anticuerpos humanizados tienen residuos del marco de la región variable esencialmente de un anticuerpo humano (denominado anticuerpo aceptor) y regiones determinantes de la complementariedad (regiones CDR) esencialmente de un anticuerpo de ratón, (referido como inmunoglobulina donadora). Véase, Queen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029-10033 (1989) y los documentos WO 90/07861, U.S. 5.693.762, 5.693.761, 5.585.089, 5.530.101 y 5.225.539. La región o las regiones constantes, si están presentes, también son esencialmente o completamente de una inmunoglobulina humana. Los dominios variables humanos se seleccionan normalmente entre los anticuerpos humanos cuyas secuencias del marco muestran un alto grado de identidad de secuencia con los dominios de la región variable murina de la cual derivan las CDR. Los residuos del marco de la región variable de la cadena pesada y ligera pueden derivar de las mismas o diferentes secuencias de anticuerpos humanos. Las secuencias de anticuerpos humanos pueden ser las secuencias de anticuerpos humanos de origen natural o pueden ser secuencias consenso de varios anticuerpos humanos. Véase el documento WO 92/22653. Ciertos aminoácidos de los residuos del marco de la región variable humana se seleccionan para la sustitución basándose en su posible influencia sobre la conformación de las CDR y/o la unión al antígeno. La investigación de estas posibles influencias se realiza mediante modelado, examen de las características de los aminoácidos en localizaciones concretas, u observación empírica de los efectos de la sustitución o la mutagénesis de aminoácidos concretos. Por ejemplo, cuando un aminoácido difiere entre un residuo del marco de la región variable murina y un residuo del marco de la región variable humana seleccionada, el aminoácido del marco humano debe ser sustituido normalmente por el aminoácido del marco equivalente del anticuerpo de ratón cuando se espere razonablemente que el aminoácido: (1) se una directamente al antígeno de manera no covalente; (2) sea adyacente a una región CDR; (3) interactúe de otro modo con una región CDR (p. ej. esté a aproximadamente 6 Å de una región CDR), o (4) participe en la interfaz V_L-V_H. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos del marco humano aceptor que no son habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Estos aminoácidos pueden ser sustituidos por aminoácidos de la posición equivalente del anticuerpo donador de ratón o de las posiciones equivalentes de inmunoglobulinas humanas más típicas. Otros candidatos para la sustitución son los aminoácidos del marco humano aceptor que no son habituales para una inmunoglobulina humana en esa posición. Los marcos de la región variable de las inmunoglobulinas humanizadas muestran normalmente una identidad de secuencia de al menos 85% con la secuencia del marco de la región variable humana o el consenso de tales secuencias.

Los anticuerpos completamente humanos se pueden elaborar mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, en el documento US 6.596.541 se describe un método para generar anticuerpos completamente humanos. En resumen, inicialmente se genera un animal transgénico tal como un ratón que produce anticuerpos híbridos que contienen regiones variables humanas (VDJ/VJ) y regiones constantes de ratón. Esto se completa mediante una reposición directa, in situ de los genes de la región variable de ratón (VDJ/VJ) por sus contrapartes humanas. Después el ratón se expone a un antígeno humano, o uno de sus fragmentos inmunogénicos. Los loci de la inmunoglobulina híbrida resultante experimentarán el proceso natural de transposiciones durante el desarrollo de las células B para producir anticuerpos híbridos que tienen la especificidad deseada. El anticuerpo de la invención se selecciona como se ha descrito antes. Con posterioridad, se elaboran anticuerpos completamente humanos reemplazando las regiones constantes de ratón por las contrapartes humanas deseadas. Los anticuerpos completamente humanos también se pueden aislar a partir de ratones u otros animales transgénicos tales como vacas que expresan transgenes humanos o minicromosomas para los loci de las cadenas pesada y ligera. (Green (1999) J Immunol Methods. 231: 11-23 e Ishida et al. (2002) Cloning Stem Cells. 4: 91-102). También se pueden aislar anticuerpos completamente humanos a partir de humanos a los que se ha administrado la proteína. También se pueden aislar anticuerpos completamente humanos a partir de ratones inmuno-comprometidos cuyos sistemas inmunitarios han sido regenerados mediante injerto con células pluripotenciales humanas, esplenocitos, o células de sangre periférica (Chamat et al (1999) J Infect Dis. 180: 268-77). Para intensificar la respuesta inmunitaria a la proteína de interés se puede desactivar el gen que codifica la proteína de interés en el animal transgénico para el anticuerpo humano.

Dominios de unión al receptor. De acuerdo con la invención, los constructos de ácido nucleico incluyen componentes que codifican dominios de unión derivados de ligandos del receptor diana. Después de la identificación de un dominio de unión al receptor diana del ligando que muestra características de unión deseadas, se utiliza el ácido nucleico que codifica semejante dominio en los constructos de ácido nucleico. Estos ácidos nucleicos se pueden modificar, incluyendo adiciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos y/o que portan sitios de restricción, deleciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos, o sustituciones de secuencias de nucleótidos que codifican aminoácidos.

Los constructos de ácido nucleico de la invención se insertan en un vector de expresión o un vector viral mediante métodos conocidos en la técnica, donde la molécula de ácido nucleico está conectada operativamente a una secuencia de control de la expresión. Asimismo se proporciona un sistema de anfitrión-vector para la producción de los polipéptidos de fusión y los dímeros activadores de la invención, que comprende el vector de expresión de la invención, que ha sido introducido en una célula anfitriona adecuada. La célula anfitriona adecuada puede ser una

célula bacteriana tal como *E. coli*, una célula de levadura, tal como *Pichia pastoris*, una célula de insecto, tal como *Spodoptera frugiperda*, o una célula de mamífero, tal como una célula COS, CHO, 293, BHK o NSO.

5 La invención abarca adicionalmente métodos para producir los dímeros activadores de la invención haciendo crecer células transformadas con un vector de expresión en condiciones que permiten la producción de los polipéptidos de fusión y la recuperación de los dímeros activadores formados a partir de los polipéptidos de fusión. También se pueden transducir células con un virus recombinante que comprende el constructo de ácido nucleico de la invención.

10 Los dímeros activadores se pueden purificar mediante cualquier técnica, que permita la subsiguiente formación de un dímero estable. Por ejemplo, y no a modo de limitación, los dímeros activadores se pueden recuperar de las células en forma de polipéptidos solubles o en forma de cuerpos de inclusión, a partir de los cuales se pueden extraer cuantitativamente por medio de hidrócloruro de guanidinio 8 M y diálisis. Con el fin de purificar adicionalmente los dímeros activadores, se puede utilizar la cromatografía de intercambio iónico convencional, la cromatografía de interacción hidrófoba, la cromatografía de fase inversa o la filtración en gel. Los dímeros activadores también se pueden recuperar del medio acondicionado después de la secreción procedente de células eucarióticas o procarióticas.

15 **Métodos de Escrutinio y Detección**

20 Los dímeros activadores de la invención también se pueden utilizar en métodos de escrutinio *in vitro* o *in vivo* en los que es deseable detectar y/o medir los niveles de receptor diana. Los métodos de escrutinio son bien conocidos en la técnica e incluyen análisis sin células, basados en células, y en animales. Los análisis *in vitro* pueden ser en estado sólido o solubles. La detección del receptor diana se puede lograr por numerosas formas conocidas en la técnica, incluyendo el uso de una marca o un grupo detectable capaz de identificar un dímero activador que está unido a un receptor diana. Las marcas detectables están bien desarrolladas en el campo de los inmunoanálisis y generalmente se pueden utilizar junto con análisis en los que se utiliza el dímero activador de la invención.

Métodos Terapéuticos

25 La capacidad de los dímeros activadores de la invención para mostrar una unión de alta afinidad con sus receptores los hace particularmente útiles para activar eficazmente sus receptores. De este modo, en ciertos casos puede ser para incrementar el efecto de ligandos endógenos para los receptores diana, tales como, por ejemplo, las efrinas. Por ejemplo, en la zona de un trauma del sistema nervioso, ciertas afecciones se pueden beneficiar de un incremento de la sensibilidad a la efrina. Puede resultar beneficioso por consiguiente aumentar la afinidad de unión de una efrina en pacientes que padecen tales afecciones por medio del uso de las composiciones descritas en la presente memoria.

30 La invención proporciona aquí adicionalmente el desarrollo de un dímero activador descrito en la presente memoria como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes que padecen trastornos que implican células, tejidos u órganos que expresan el receptor Tie-2. Estas moléculas se pueden utilizar en un método de tratamiento del organismo humano o animal, o en un método de diagnóstico.

35 El receptor diana conocido como receptor Tie-2 ha sido identificado asociado con las células endoteliales y, como se ha mostrado previamente, se ha demostrado que el bloqueo de los agonistas del receptor tales como el ligando 1 de Tie-2 (Ang1) evita la vascularización. Por consiguiente, los dímeros activadores de la invención donde el receptor diana es Tie-2 pueden ser útiles para la inducción de la vascularización en enfermedades o trastornos en los que está indicada dicha vascularización. Tales enfermedades o trastornos incluirían la curación de heridas, la isquemia y la diabetes. Los ligandos se pueden someter a ensayo en modelos animales y utilizarlos terapéuticamente como se ha descrito para otros agentes, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), otro factor específico de células endoteliales que es angiogénico. Ferrara et al. Patente de los Estados Unidos Núm. 5.332.671 presentada el 26 de Julio de 1994. Ferrara et al. describen estudios *in vitro* e *in vivo* que se pueden utilizar para demostrar el efecto de un factor angiogénico en el aumento del flujo sanguíneo hacia el miocardio isquémico, la intensificación de la curación de heridas, y otros escenarios terapéuticos en los que se desea la neo-angiogénesis. De acuerdo con la invención, este dímero activador específico de Tie-2 se puede utilizar solo o combinado con uno o más compuestos farmacéuticamente activos adicionales tales como, por ejemplo, VEGF o el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF).

Métodos de Administración

50 Se pueden utilizar los métodos conocidos en la técnica para la liberación terapéutica de agentes tales como proteínas o ácidos nucleicos para la liberación terapéutica de un dímero activador o un ácido nucleico que codifica un dímero activador de la invención para activar receptores diana en un sujeto, p. ej., la transfección celular, la terapia génica, la administración directa con un vehículo de liberación o un portador farmacéutico aceptable, la liberación indirecta proporcionando células recombinantes que comprenden un ácido nucleico que codifica un dímero activador de la invención.

Se conocen diferentes sistemas de liberación y se pueden utilizar para administrar el dímero activador de la invención, p. ej., la encapsulación en liposomas, las micropartículas, las microcápsulas, las células recombinantes

capaces de expresar el compuesto, la endocitosis mediada por receptores (véase, p. ej., Wu y Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262: 4429-4432), la construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de introducción pueden ser entéricos o parenterales e incluyen pero no están limitados a las rutas intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, pulmonar, intranasal, intraocular, epidural, y oral. Los compuestos se pueden administrar mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección de bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (p. ej., mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo la inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, anclado a un reservorio, tal como un reservorio Ommaya. También se puede emplear la administración pulmonar, p. ej., mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y mediante la formulación con un agente aerosolizante.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención localmente en la zona que necesita tratamiento; esto se puede lograr, por ejemplo, y no a modo de limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, p. e., mediante inyección, por medio de un catéter, o por medio de un implante, siendo dicho implante de material poroso, no poroso o gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas, fibras, o sucedáneos de la piel comerciales.

En otra realización, el agente activo puede ser liberado en una vesícula, en particular un liposoma (véase Langer (1990) Science 249: 1527-1533). En otra publicación más, el agente activo se puede liberar con un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede utilizar una bomba (véase Langer (1990) *supra*).

Composiciones Farmacéuticas

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden un dímero activador de la invención y un portador farmacéuticamente aceptable. El término "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del Gobierno Federal o del estado o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos u otra farmacopea generalmente reconocida para el uso en animales, y más concretamente en seres humanos. El término "portador" hace referencia a un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con el cual se administra el agente terapéutico. Tales portadores farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen de petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral y aceite de sésamo. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche en polvo desnatada, glicerol, propilenglicol, agua y etanol. Si se desea, la composición también puede contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponadores del pH. Estas composiciones pueden adoptar la forma de soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos y formulaciones de liberación sostenida. La composición se puede formular en forma de supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como los triglicéridos. La formulación oral incluye vehículos convencionales tales como calidades comerciales de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa y carbonato de magnesio. Los ejemplos de los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios en forma de una composición farmacéutica adaptada para la administración intravenosa a seres humanos. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local tal como lidocaína para calmar el dolor en el sitio de la inyección. Cuando la composición se va a administrar por medio de infusión, ésa se puede dispensar con una botella de infusión que contenga agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Cuando la composición se va a administrar por medio de inyectables, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyectables o solución salina de manera que los ingredientes se puedan mezclar antes de su administración.

Los agentes activos de la invención se pueden formular en forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen aquellas formadas con grupos amino libres tales como los derivados de los ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc. y aquellas formadas con grupos carboxilo libres tales como los derivados de los hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, férrico, isopropilamina, trietilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína, etc.

Kits

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con al menos un dímero activador de la invención. Opcionalmente se pueden asociar a tales recipientes notas de la manera prescrita por la agencia gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyas notas reflejan (a) la aprobación por la agencia de fabricación, uso o venta para la administración en seres humanos, (b) las instrucciones para su uso, o ambas.

Animales Transgénicos

La invención incluye animales no humanos que expresan un polipéptido de fusión de la invención. Se puede producir un animal transgénico introduciendo un ácido nucleico en los pronúcleos macho de un oocito fertilizado, p. ej., mediante microinyección, infección retroviral, y permitiendo que se desarrolle el oocito en un animal de acogida hembra pseudopreñado. Cualquiera de las secuencias reguladoras u otras secuencias útiles en los vectores de expresión puede formar parte de la secuencia transgénica. Se pueden conectar operablemente una o varias secuencias reguladoras específicas de un tejido al transgén para dirigir la expresión del transgén a células concretas. Un animal no humano transgénico que expresa un polipéptido de fusión de la invención es útil en una variedad de aplicaciones, que incluyen un medio de producción de tales proteínas de fusión.

10 EJEMPLOS

Ejemplo 1. Producción de Hibridomas Anti-Tie-2

En primer lugar se inmunizaron cinco ratones Balb/c de 8 semanas de edad con Tie-2-Fc humano purificado (hTie2-Fc); se inyectaron subcutáneamente a cada animal 200 μ l de emulsión que contenía 100 μ g de proteína hTie2-Fc purificada y 100 μ l de coadyuvante completo de Freund. Quince días después de la primera inyección, cada ratón recibió una inyección subcutánea de 200 μ l de emulsión que contenía 100 μ g de hTie2-Fc purificada en 100 μ l de PBS y 100 μ l de coadyuvante incompleto de Freund. Esta inyección se repitió para los cinco ratones siete días más tarde. Se utilizó un ratón para la generación de hibridomas contra hTie-2. Se administraron a cada uno de los cuatro ratones restantes inyecciones subcutáneas de 200 μ l de emulsiones que contenían cada una 100 μ g de Tie-2-Fc de rata purificada (rTie2-Fc) en 100 μ l de PBS y 100 μ l de coadyuvante de Freund incompleto después de la primera inyección de hTie2-Fc. Once días más tarde, se reforzó la respuesta inmunitaria de los ratones a rTie2-Fc mediante una inyección subcutánea de 200 μ l de emulsión que contenía 100 μ g de rTie2-Fc purificada en 100 μ l de PBS y 100 μ l de coadyuvante incompleto de Freund para cada ratón. Se recogieron los sueros de los ratones de la vena de la cola tres días después de la inyección, después se determinaron los títulos de anticuerpo frente a rTie2-Fc por medio de ELISA. A los dos ratones con los títulos más elevados se les administró un refuerzo final por medio de una inyección en la vena de la cola de 100 μ g de rTie2-Fc purificada en 100 μ l de PBS. Los ratones se sacrificaron tres días más tarde y se recogieron sus bazo para la fusión con células Sp2/0-Ag14.

Para generar los hibridomas, se fusionaron células de bazo de ratón con células de mieloma Sp2/0-Ag14 utilizando polietilenglicol (PEG). En resumen, después de separar asépticamente los bazo de los ratones, se abrió una punta de cada bazo y se recogieron células del bazo. Las células de bazo se lavaron dos veces con D-MEM y se contó el número de células utilizando un hemocitómetro. Se combinaron 2×10^8 células de bazo con 3×10^7 células Sp2/0-Ag14 que se encontraban en la fase de crecimiento log. La mezcla de células se lavó con 30 ml de D-MEM. Se añadió lentamente 1 ml de PEG al 50% a 37°C al sedimento celular mientras se agitaba. Se añadió a la mezcla D-MEM para llevar el volumen a 10 ml. Las células se centrifugaron a 400 x g durante 10 minutos. Tras la eliminación del sobrenadante, las células se suspendieron suavemente en 20 ml de medio de crecimiento que contenía D-MEM al 60% con 4,5 g/L de glucosa, FCS al 20%, medio NCTC109 al 10%, factor de clonación de hibridoma al 10%, oxaloacetato 1 mM, glutamina 2 mM, 0,2 unidades/ml de insulina, y glicina 3 M. Las células se transfirieron a dos matraces T225, que contenían cada uno 100 ml del medio de crecimiento y se colocaron en una incubadora para el cultivo de tejidos. Al día siguiente, se añadió 1 x HAT al medio para la selección frente a las células de mieloma que no se habían fusionado. Nueve días después de la fusión, los cultivos se reabastecieron con medio de nueva aportación. Se añadió IgG humana a los cultivos a 1 mg/ml. Al décimo día de la fusión, se tiñeron $2,6 \times 10^7$ células fusionadas sucesivamente con 1 μ g/ml de biotina-rTie2-Fc durante una hora y 2,5 μ g/ml de estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE) durante 45 minutos en medio de crecimiento a la temperatura ambiente. Como control, se tiñeron 1×10^6 células fusionadas con 2,5 μ g/ml de PE-estreptavidina durante 45 minutos a la temperatura ambiente. Las células se lavaron con 10 ml de PBS después de cada tinción. Después de la tinción, las células se resuspendieron en PBS con FCS al 0,1% y se analizaron mediante citometría de flujo en un MoFlo (Cytomation). Una población de células (4% de las células totales) teñidas tanto con biotina-rTie2-Fc como con PE-estreptavidina mostró una fluorescencia mayor que las células no teñidas y que las células teñidas con PE-estreptavidina solamente. Las células de esta selección del 4% se clonaron clasificando las células individuales en dos placas de 96 pocillos que contenían 200 μ l de medio de crecimiento por pocillo. Las células se cultivaron durante 10 días antes de separarlas en dos grupos de placas de 96 pocillos. Las células de un grupo de placas se trataron para la RT-PCR de la región variable de la cadena pesada de la IgG de ratón seguida de secuenciación. Los clones se agruparon en 14 botes, teniendo los miembros de cada bote una secuencia idéntica en su región variable de la cadena pesada. Se sometió a ensayo el medio acondicionado de células de hibridoma de cada bote para determinar su capacidad para estimular la fosforilación de rTie-2 en células endoteliales aórticas de rata cultivadas (RAEC). Los anticuerpos de dos hibridomas, B2 y A12A, se seleccionaron para su estudio adicional porque eran activos en la fosforilación de Tie-2 en las RAEC, y no competían por la unión a rTie-2 según se determinó mediante análisis BIAcore. Además, estos anticuerpos no bloquearon la unión de los derivados de angiopoyetina-1 (Ang1) y angiopoyetina-2 (Ang2), los ligandos naturales de Tie-2.

Ejemplo 2. Construcción de ScFv (B2 y A12A).

Generalmente, se clonaron regiones variables de anticuerpos procedentes de hibridomas que expresan anticuerpos específicos para rTie-2 determinando primero la secuencia de ADN de los productos de la RT-PCR utilizando cebadores específicos para las regiones variables de los anticuerpos de ratón, utilizando después cebadores específicos basándose en la secuencia determinada con el fin de amplificar los fragmentos de ADN que codifican los ScFv. Se clonaron los fragmentos de ADN de ScFv de manera que pudieran ser una casete intercambiada con múltiples plásmidos para producir todas las combinaciones de dímeros activadores. Por ejemplo, se pudo fusionar un fragmento ScFv amplificado con una secuencia señal en el extremo N y a una secuencia codificante del dominio Fc de IgG en el extremo C, o se pudo fusionar al extremo C de una secuencia codificante de Fc de IgG de manera que el extremo 3' de la secuencia codificante de ScFv contuviera un codón de terminación de la traducción.

Se encontró que el hibridoma B2 expresaba un anticuerpo capaz de inducir la fosforilación del receptor de Tie-2 en RAEC. Se aisló el ARN total procedente de este hibridoma utilizando el Sistema de Aislamiento de ARN Total SV96 de Promega (Promega) y se sintetizó un ADNc pesado variable utilizando el sistema de RT-PCR de Una Etapa de Qiagen (Qiagen) con cebadores pesados del grupo de cebadores Ratner (Wang et al. (2000) J. Immunol. Methods 233: 167) que incluía cantidades equimolares de los cebadores 5' (SEQ ID NO: 1-7) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 8). De un modo similar, se amplificaron las regiones variables de la cadena ligera a partir del ADNc utilizando cantidades equimolares de los cebadores específicos de la cadena ligera (SEQ ID NO: 9 y 10). Los fragmentos de la región variable amplificada se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de ADN. Basándose en las secuencias de la región variable determinadas para el anticuerpo B2, se amplificó mediante PCR la secuencia pesada variable utilizando la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20). La secuencia ligera variable se amplificó mediante PCR utilizando una estrategia similar. Se utilizó la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22). Las regiones variables se unieron por medio de un conector (G4S)₃; se ensamblaron los genes de ScFv y se amplificaron por medio de PCR utilizando una mezcla equimolar de los productos de la PCR pesado variable y ligero variable específicos y una mezcla equimolar de cebador pesado de B2 5' (SEQ ID NO: 19) y cebador ligero 3' (SEQ ID NO: 22). El producto de la PCR se clonó en pCR2.1-TOPO de Invitrogen (Invitrogen) para dar pRG1039. La secuencia se confirmó antes de la subclonación de *Ascl/Srfl* de 744 pb para fusionar el gen ScFv al extremo N-terminal de un ADN que codificaba el fragmento Fc de IgG1 humana (hFc), o los fragmentos de restricción *Ascl/NotI* de 753 pb para fusionar el mismo ScFv al extremo C de un ADN que codifica hFc.

También se encontró que el hibridoma A12A expresaba un anticuerpo capaz de inducir la fosforilación del receptor de Tie-2 en RAEC. Se aisló el ARN total procedente de este hibridoma utilizando el kit de purificación de ARNm Quick Prep (Amersham Pharmacia Biotech) y se sintetizó el ADNc pesado variable utilizando el sistema de RT-PCR de Qiagen, con cantidades equimolares de cebadores del grupo de cebadores Wright (Morrison et al. (1995) Antibody Engineering, segunda edición, Borrebaeck, C. K. A. editor 267-293) que incluía los cebadores de la cadena pesada 5' (SEQ ID NO: 11-13) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 8). De un modo similar, se amplificaron las regiones variables de la cadena ligera a partir del ADNc con cantidades equimolares de los cebadores de la cadena pesada 5' (SEQ ID NO: 14-18) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 10). Los fragmentos de la región variable amplificada se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de ADN.

Basándose en las secuencias de la región variable determinada para el anticuerpo A12A, se amplificó mediante PCR la secuencia pesada variable utilizando la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24). La secuencia ligera variable se amplificó mediante PCR utilizando una estrategia similar. Se utilizó la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26). Las regiones variables se unieron por medio de un conector (G4S)₃; se ensamblaron los genes de ScFv y se amplificaron mediante PCR utilizando una mezcla equimolar de los productos de la PCR pesado variable y ligero variable específicos anteriores y una mezcla equimolar del cebador pesado A12A 5' (SEQ ID NO: 23) y el cebador ligero 3' (SEQ ID NO: 26). El producto de la PCR se clonó en pCR2.1-TOPO de Invitrogen para dar pRG1090. Se confirmó la secuencia antes de la subclonación de *Ascl/Srfl* de 747 pb para fusionar el gen de ScFv al extremo N de un ADN que codifica el fragmento hFc.

Ejemplo 3. Construcción de Dímeros Activadores Monoespecíficos y Biespecíficos

El esquema general para construir dímeros activadores tetravalentes tanto monoespecíficos como biespecíficos se basó en la capacidad de los genes de ScFv B2 o A12A para ser insertados entre la secuencia señal murina ROR1 (SEQ ID NO: 27) y el gen que codifica hFc (nucleótidos 85 a 765 del Núm. de Acceso GenBank X70421) cuando se cortaban con un grupo de enzimas de restricción, o después del gen de hFc si se cortaban con un grupo diferente de enzimas. Este diseño de los genes de ScFv permitió el intercambio de casetes de ScFv entre plásmidos para obtener diferentes combinaciones de ScFv y hFc utilizando métodos conocidos convencionales. Todos los constructos tienen un conector de tres aminoácidos opcional (espaciador) entre el sitio de escisión del péptido señal y el inicio del gen de ScFv, resultante del diseño de un sitio de restricción en el extremo 5' de los genes de ScFv. De un modo similar, se facilitó la fusión al extremo amino del gen de hFc por medio de una secuencia de tres aminoácidos (Gly-Pro-Gly), y se facilitó la fusión al extremo carboxi del gen de hFc por medio de una secuencia de

ocho aminoácidos que consistía en los residuos Gly4-Ser-Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 32). Como consecuencia de los conectores de los sitios de restricción terminales en los genes de ScFv, todos los constructos que tienen un ScFv carboxi terminal acaban con los aminoácidos Gly-Pro-Gly.

5 Se construyeron dos tipos de moléculas quiméricas basadas en svFc para evaluar la capacidad de las moléculas basadas en ScFv para activar el receptor rTie-2. Un tipo de molécula utilizó un único ScFv fusionado al extremo N y al extremo C de hFc, cuya consecuencia era una molécula tetravalente monoespecífica capaz de unirse a rTie-2. Se esperaba que esta molécula fuera capaz de unirse simultáneamente a cuatro moléculas de rTie-2. El plásmido pTE586 codifica el gen para SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} (SEQ ID NO: 29) cuya secreción está dirigida por el péptido señal mROR1. La expresión de SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} en pTE586 estaba dirigida por el promotor de CMV-MIE cuando se transflectaba en células CHO. Esta proteína era fácilmente purificada mediante cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa.

15 La construcción de una molécula ScFv-Fc-ScFv donde los dos dominios ScFv derivan de dos anticuerpos anti-rTie-2 no competitivos diferentes daría una molécula capaz de agrupar más de cuatro receptores, en contraste con la SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} descrita antes, que solamente puede agrupar cuatro receptores. Se determinó mediante análisis BIAcore que la unión del anticuerpo B2 no bloqueaba la unión de A12A a rTie-2, y que la unión a A12A primero no bloqueaba la unión de B2. Por consiguiente, las moléculas de ScFv elaboradas a partir de estos anticuerpos deberían ser capaces de agrupar más de cuatro receptores. Para construir una molécula basada en ScFv tetravalente biespecífica, se utilizó el gen SCFV_{A12A} combinado con el gen SCFV_{B2} para dar SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2} (SEQ ID NO: 28). El plásmido pTE585 codifica el gen para SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2} y tiene el péptido señal mROR1 y el promotor de CMV-MIE cuando se transfecta en células CHO. Tanto SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} como SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2} fueron expresadas en células CHO, y purificadas mediante cromatografía de afinidad con Proteína A-Sefarosa.

Ejemplo 4. Análisis

25 Se evaluaron los anticuerpos para rTie-2, y las moléculas quiméricas relacionadas con estos anticuerpos, para determinar su capacidad para inducir la fosforilación de Tie-2 en células endoteliales aórticas de rata cultivadas. Se hicieron crecer RAEC confluentes, entre el paso 3 y el 6 (Vec Technologies), en medio MCDB-131 (Vec Technologies) sobre matraces T-75 recubiertos con gelatina al 0,2%. Las células se privaron de alimento durante 2 horas en medio DME-Hi glucosa sin suero (Irvine Scientific) antes de la incubación a 37°C durante 5 min. en 1,5 ml de medio DME-Hi glucosa sin suero con BSA al 0,1% y la molécula de sensibilización. El medio de sensibilización se separó después y las células se lisaron en Tris 20 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, benzamidina 5 mM, EDTA 1 mM, NP-40 al 1%, desoxicolato de sodio al 0,5%, SDS al 0,1%, con 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, y PMSF 1 mM.

35 Se inmunoprecipitó Tie-2 incubando los productos lisados a 4°C durante 16 horas con 5 µg de anticuerpo monoclonal anti-Tie-2 de ratón KP-m33, 10 µg de anti-IgG de ratón biotinilada (Jackson Laboratories), y 100 µl de cuentas de neutravidina (Pierce). Las cuentas se recogieron mediante centrifugación, se lavaron 3 veces con tampón RIPA, y las proteínas unidas se hicieron eluir con 40 µl de 5X tampón de Laemmli con B-mercaptoetanol al 10% calentando a 100°C durante 5 min. Después de la electroforesis en gel-SDS sobre un gel de poliacrilamida con Tris/Glicina al 4-12% (Novex), las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF y sondeadas con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosina de ratón 4G10 (Upstate), después se detectaron utilizando producto conjugado con HRP de IgG anti-ratón de cabra (Pierce) seguido de reactivo ECL (Amersham). Se determinó la capacidad para inducir la fosforilación de Tie-2 en RAEC para cada dímero activador.

45 Se evaluó la actividad mediante la comparación del nivel de estimulación obtenido con FD1-Fc-FD1 (BA1) – una proteína quimérica que se ha demostrado que es activa como Ang1 en la unión y la activación de Tie-2 (Davis et al. (2003) Nature Struct. Biol. 10: 38-44) (FD1 o FD2 = dominio de fibrinógeno humano de Ang1 o Ang2, respectivamente). Se observó una estimulación máxima (CEmax) de Tie-2 en las RAEC cuando se utilizó BA1 a aproximadamente 0,5 a 1,0 µg/ml, y los niveles de fosforilación en las células tratadas simuladamente fueron bajos.

De un modo similar, las CEmax de SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2}, SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2}, SCFV_{B2}-Fc-FD1, y SCFV_{B2}-Fc-FD2 fueron de aproximadamente 0,5 a 1,0 µg/ml. En todos los casos, las moléculas basadas en ScFv fueron capaces de inducir una señal de fosforilación superior a la observada para los anticuerpos nativos relacionados aislados de medios acondicionados de hibridoma.

50 Se caracterizaron SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} y SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2} por su capacidad para unirse a rTie-2 e inducir la fosforilación. La unión a rTie-2 se determinó mediante análisis BIAcore. Se encontró que los dímeros activadores tanto monoespecíficos como biespecíficos tenían una afinidad por rTIE-2 superior a la de FD1-Fc-FD1. Además, tanto SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} como SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2} fueron capaces de estimular la fosforilación de rTie-2 en RAEC en comparación con FD1-Fc-FD1.

55 Ejemplo 5. Construcción de Dímeros Activadores de ScFv/Ligando

Se construyeron moléculas tetravalentes biespecíficas para que incluyeran los ScFv específicos de Tie-2 FD1 o FD2. Las moléculas quiméricas se elaboraron fusionando el gen que codificaba SCFV_{B2} con el extremo N de hFc y el

gen que codificaba Ang1 FD (Phe283 a Phe498 de Núm. de acceso GenBank Q15389) o Ang2 FD (Phe281 a Phe496 de Núm. de acceso GenBank 015123) al extremo C.

El plásmido pTE514 codifica el gen para SCFV_{B2}-Fc-FD1 (SEQ ID NO: 30) y contenía el péptido señal mROR1 y el promotor de CMV-MIE. El plásmido pTE614 codifica el gen para SCFV_{B2}-Fc-FD2 (SEQ ID NO: 31) y contenía el péptido señal mROR1 y el promotor de CMV-MIE. De un modo similar a SCFV_{B2}-Fc-SCFV_{B2} y SCFV_{A12A}-Fc-SCFV_{B2}, las proteínas expresadas a partir de pTE514 y pTE614 tenían un conector Gly-Ala-Pro entre el péptido señal mROR1 y el SCFV_{B2}, un conector Gly-Pro-Gly entre el SCFV_{B2} N-terminal y hFc y un conector Gly4-Ser-Gly-Ala-Pro (SEQ ID NO: 32) entre el extremo C de hFc y el extremo N de los Ang FD. Tanto SCFV_{B2}-Fc-FD1 como SCFV_{B2}-Fc-FD2 fueron expresados y purificados como se ha descrito antes.

Los SCFV_{B2}-Fc-FD1 y SCFV_{B2}-Fc-FD2 purificados fueron caracterizados por su capacidad para unirse a rTie-2 e inducir la fosforilación como se ha descrito antes. Según se determinó mediante el análisis BIAcore, se encontró que el dímero activador quimérico SCFV_{B2}-Fc-FD1 tenía una afinidad significativamente mayor por rTie-2 (0,04 nM) que FD1-Fc-FD1 (2 nM). Por otra parte, tanto SCFV_{B2}-Fc-FD1 y SCFV_{B2}-Fc-FD2 fueron capaces de estimular la fosforilación de rTie-2 en RAEC en comparación con FD1-Fc-FD1.

15 **Ejemplo 6. Construcción de Dímeros Activadores Totalmente Humanos**

Se forman moléculas tetravalentes biespecíficas a partir de constructos de fusión dimerizados de la invención que incluyen dos ScFv derivados de anticuerpos humanos específicos para hTie-2 o un ScFv derivado de un anticuerpo humano específico para hTie-2 y FD1 o FD2 humano. Los ScFv humanos específicos para hTie-2 se obtienen mediante métodos conocidos en la técnica y como se ha descrito antes. En una realización, se obtienen recombinantemente ScFv humanos como describen Reiter et al. (1999) J. Mol. Biol. 290: 685-698 y Gilliland et al. (1996) Tissue Antigens 47 (1): 1-20.

Ejemplo 7. Construcción de ScFv (1-1F11 y 2-1G3).

Se produjeron hibridomas anti-rTie-1 siguiendo los procedimientos descritos antes para la producción de hibridomas anti-rTie-2. En resumen, se inmunizaron ratones tres veces con proteína Tie-1-Fc de rata y coadyuvante de Freund. Se fusionaron células de bazo de ratón con el título de anticuerpo anti-Tie-1 más elevado con células de mieloma Sp2/0-Ag14 utilizando polietilenglicol (PEG). Después de la fusión, las células se cultivaron en dos matraces T225. Se añadió HAT a los cultivos al día siguiente. Nueve días después de la fusión, se reabastecieron los cultivos con medio de nueva aportación. Se añadió IgG humana a los cultivos a 1 mg/ml. El décimo día después de la fusión, las células resistentes a HAT se tiñeron sucesivamente con 1 µg/ml de biotina-Tie-1-Fc de rata durante una hora y 2,5 µg/ml de estreptavidina conjugada con ficoeritrina (PE) durante 45 minutos en medio de crecimiento a la temperatura ambiente. Después de tefñir, las células se analizaron mediante citometría de flujo. Las células que se habían unido a rTie1-Fc se clonaron clasificando las células individuales en placas de 96 pocillos. Los cultivos en placas de 96 pocillos se dividieron en dos grupos diez días después de la clasificación. Las RT-PCR de la región variable de la cadena pesada de IgG de ratón seguidas de ecenciación se realizaron sobre un grupo de cultivos en placa de 96 pocillos. Los clones con secuencias de la región variable de la cadena pesada de IgG únicas se identificaron y se expandieron para la producción de anticuerpos anti-rTie-1. Los anticuerpos se sometieron a ensayo para determinar la unión de la proteína rTie-1 y se seleccionaron dos clones, 1-1F11 y 1-2G3, para un estudio más detallado.

Se encontró que el hibridoma 1-1F11 expresaba un anticuerpo capaz de inducir la fosforilación del receptor de Tie-1 en RAEC. Se aisló el ARN mensajero y se sintetizó el ADNc pesado variable como se ha descrito antes con cebadores para la cadena pesada del grupo de cebadores Wright (Morrison et al. (1995) Antibody Engineering, segunda edición, Borrebaeck, C. K. A. editor 267-293) que incluía los cebadores de la cadena pesada 5' (SEQ ID NO: 35-37) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 33). De un modo similar, se amplificaron las regiones variables de la cadena ligera a partir del ADNc con cantidades equimolares de los cebadores de la cadena ligera 5' (SEQ ID NO: 38-41) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 34). Los fragmentos de la región variable amplificada se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de ADN. Basándose en las secuencias de la región variable determinadas para el anticuerpo 1-1F11, se amplificó mediante PCR la secuencia pesada variable utilizando la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 42 y SEQ ID NO: 43). La secuencia ligera variable se amplificó mediante PCR utilizando una estrategia similar. La región variable clonada en pCR2.1-TOPO se utilizó como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 45). Las regiones variables se unieron por medio de un conector (G₄S)₃; los genes ScFv se ensamblaron y se amplificaron por medio de PCR utilizando una mezcla equimolar de los productos de la PCR de la cadena pesada variable y la cadena ligera variable específicas anteriores y una mezcla equimolar de cebador pesado 5' (SEQ ID NO: 42) y cebador ligero 3' (SEQ ID NO: 45). El producto de la PCR se clonó en pCR2.1-TOPO de Invitrogen (Invitrogen) para dar pRG1192. La secuencia se confirmó antes de la sub-clonación de Ascl/Srfl de 747 pb para fusionar el gen ScFv al extremo N de un ADN que codificaba el fragmento Fc de la IgG1 humana (hFc), o los fragmentos de restricción Ascl/NotI de 756 pb para fusionar el mismo ScFv al extremo C de un ADN que codificaba hFc.

También se encontró que el hibridoma 2-1G3 expresaba un anticuerpo capaz de inducir la fosforilación del receptor de Tie-1 en RAEC. Se aisló el ARN mensajero y se sintetizó el ADNc pesado variable como se ha descrito antes con

cantidades equimolares de cebadores del grupo de cebadores de Wright (Morrison et al. (1995) supra) que incluían los cebadores de la cadena pesada 5' (SEQ ID NO: 35-37) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 33). De un modo similar, se amplificaron las regiones variables de la cadena ligera a partir del ADNc con cantidades equimolares de los cebadores de la cadena pesada 5' (SEQ ID NO: 38-41) y el cebador 3' (SEQ ID NO: 34). Los fragmentos de la región variable amplificadas se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y se determinaron las secuencias de ADN.

Basándose en las secuencias de la región variable determinadas para el anticuerpo 2-1G3, se amplificó mediante PCR la secuencia pesada variable utilizando la región variable clonada en pCR2.1-TOPO como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47). La secuencia ligera variable se amplificó mediante PCR utilizando una estrategia similar. La región variable clonada en pCR2.1-TOPO se utilizó como molde y una mezcla equimolar de cebadores 5' y 3' (SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 49). Las regiones variables se unieron por medio de un conector (G4S)₃; los genes ScFv se ensamblaron y se amplificaron mediante PCR utilizando una mezcla equimolar de los productos de la PCR pesado variable y ligero variable específicos anteriores y una mezcla equimolar del cebador pesado 2-1G3 5' (SEQ ID NO: 46) y el cebador ligero 3' (SEQ ID NO: 49). El producto de la PCR se clonó en pCR2.1-TOPO de Invitrogen (Invitrogen) para dar pRG1198. La secuencia se confirmó antes de la sub-clonación de *Ascl/Srfl* de 738 pb para fusionar el gen ScFv al extremo N de un ADN que codificaba el fragmento hFc o los fragmentos de restricción *Ascl/NotI* de 747 pb para fusionar el mismo ScFv al extremo C de un ADN que codificaba hFc.

Ejemplo 8. Construcción de Dímeros Activadores Monoespecíficos y Biespecíficos

Se construyeron dos tipos de moléculas químicas basadas en ScFv para evaluar la capacidad de las moléculas basadas en ScFv para activar el receptor rTie-1. Un tipo de molécula utilizó un único ScFv fusionado al extremo N y al extremo C de hFc, cuya consecuencia fue una molécula tetravalente mono específica capaz de unirse a rTie-1. Esta molécula debía ser capaz de unirse simultáneamente a cuatro moléculas rTie-1. El plásmido pTE778 codifica el gen para ScFv_{1-F11}-Fc-ScFv_{1-F11} (SEQ ID NO: 50) y contiene el péptido señal mROR1 y el promotor de CMV- MIE. La proteína se expresó y purificó como se ha descrito antes.

Se espera que la construcción de una molécula de ScFv-Fc-ScFv donde los dos dominios ScFv derivan de dos anticuerpos anti-rTie-1 no competitivos diferentes proporcione una molécula capaz de agrupar más de cuatro receptores, en contraste con el ScFv_{1-F11}-Fc-ScFv_{1-F11} descrito antes, que puede agrupar solamente cuatro receptores. Se determinó mediante análisis BIAcore que la unión del anticuerpo 1-1F11 no bloqueaba la unión de 2-1G3 a rTie-1, y la unión de 1-1F11 primero no bloqueaba la unión de 2-1G3. Por consiguiente, las moléculas de ScFv elaboradas a partir de estos anticuerpos deben ser capaces de agrupar más de cuatro receptores. Para construir una molécula basada en ScFv tetravalente biespecífica, el gen ScFv_{2-1G3} se utilizó combinado con el gen ScFv_{1-F11} para proporcionar ScFv_{2-1G3}-Fc-ScFv_{1-F11} (SEQ ID NO: 51). Ambos constructos fueron expresados y purificados como se ha descrito antes.

LISTADO DE SECUENCIAS

	<110>	Regeneron Pharmaceuticals, Inc.	
	<120>	Polipéptidos de fusion capaces de activar receptores	
5	<130>	1080A-WO	
	<140>	pendiente de asignar	
	<141>	14-01-2005	
	<150>	60/536,968	
	<151>	16-01-2004	
10	<160>	53	
	<170>	FastSEQ para Windows Versión 4.0	
	<210>	1	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
15	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<221>	característica_misc	
	<222>	18	
20	<223>	n = a, t, c o g	
	<400>	1	
		cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc	32
	<210>	2	
	<211>	35	
25	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<221>	característica_misc	
	<222>	18	
30	<223>	n = a, t, c o g	
	<400>	2	
		cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg	35
	<210>	3	
	<211>	34	
35	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
40	<400>	3	
		cttccggaat tccaggttac tctgaaagwg tstg	34
	<210>	4	
	<211>	32	
	<212>	ADN	
45	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<400>	4	
		cttccggaat tcgaggtcca rctgcaacar tc	32
50	<210>	5	

	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
5	<223> Cebadores	
	<400> 5	
	cttccggaat tccaggtcca actvcagcar cc	32
	<210> 6	
	<211> 32	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 6	
15	cttccggaat tcgaggtgaa sstggtggaa tc	32
	<210> 7	
	<211> 32	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
20	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 7	
	cttccggaat tcgatgtgaa ctggaagtg tc	32
	<210> 8	
25	<211> 36	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
30	<400> 8	
	ggaagatcta tagacagatg ggggtgctgt ttggc	36
	<210> 9	
	<211> 32	
	<212> ARN	
35	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 9	
	gggagctcga yatttgmts acmcarwctm	32
40	<210> 10	
	<211> 30	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
45	<223> Cebadores	
	<400> 10	
	ggtgcatgcg gatacagttg gtgcagcatc	30
	<210> 11	
	<211> 39	
50	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	

	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<400>	11	
		ggggatatcc accatggrat gsagctgkgt matsctctt	39
5	<210>	12	
	<211>	39	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
10	<223>	Cebadores	
	<400>	12	
		ggggatatca accatgract tcgggytgag ctkggtttt	39
	<210>	13	
	<211>	38	
15	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<400>	13	
20		ggggatatcc accatggctg tcttggggct gctcttct	38
	<210>	14	
	<211>	36	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
25	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<400>	14	
		ggggatatcc accatggaga cagacacact cctgctat	38
	<210>	15	
30	<211>	39	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
35	<400>	15	
		ggggatatcc accatggatt tcaggtgca gatttcag	39
	<210>	16	
	<211>	40	
40	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
	<223>	Cebadores	
	<400>	16	
		ggggatatcc accatgragt cacakacyca ggtcttyrta	40
45	<210>	17	
	<211>	40	
	<212>	ADN	
	<213>	Secuencia Artificial	
	<220>		
50	<223>	Cebadores	

<400> 17
 ggggatatcc accatgaggk cccwgtca gytyctkggr 40

 <210> 18
 <211> 37
 5 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 <400> 18
 10 ggggatatcc accatgaagt tgctgtag gctgtg 37

 <210> 19
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 15 <220>
 <223> Cebadores

 <400> 19
 gactgtctc atgcaggcg gcctcaggtt aagctggagg agctcgacc tggc 54

 <210> 20
 <211> 75
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 25 <400> 20
tgagccccct ccaccggacc ctccaccgcc cgatccaccg cccctgagg agacggtgac 60
tgaggttctc tgacc 75

 <210> 21
 <211> 75
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 <400> 21
gggggcggtg gatcgggcgg tggagggtcc ggtggagggg gctcagatat tgtgatgacc 60
cagtctccaa aatcc 75

 <210> 22
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 <400> 22
 cgatgcggcc gctcagccc ggccccgtt cagctccagc ttgtcccag cacc 54

 <210> 23
 <211> 43
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

<400> 23
gatcggcgcg cctgagggtca agctgcagga gtctggagct gag 43

<210> 24
<211> 75
5 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebadores

<400> 24
tgagccccct ccaccggacc ctccaccgcc cgatccaccg cccccctgagg agactgtgag 60
agtggtgcct tggcc 75

<210> 25
<211> 75
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Cebadores

<400> 25
gggggcggtg gatcggggcgg tggagggtcc ggtggagggg gctcagatat tgtgctgaca 60
cagtctccag ctcc 75

<210> 26
20 <211> 54
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Cebadores

25 <400> 26
cgatgcggcc gctcagcccg ggccccgttt gattccagc ttggtgcctc cacc 54

<210> 27
<211> 29
30 <212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 27
Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
1 5 10 15
Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala
20 25

<210> 28
<211> 762
35 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Sintética

<400> 28

Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gly Ala Pro
 20 25 30
 Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 35 40 45
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 50 55 60
 Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile
 65 70 75 80
 Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 85 90 95
 Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Phe Ser Asn Thr Ala Tyr
 100 105 110
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 115 120 125
 Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Leu Pro Phe Asp His Trp Gly Gln Gly Thr
 130 135 140
 Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu
 165 170 175
 Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys
 180 185 190
 Ser Val Ile Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys

		195					200				205				
Pro	Gly	Gln	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu
	210					215				220					
Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
225					230					235					240
Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr
				245						250					255
Cys	His	His	Ser	Arg	Glu	Leu	Pro	Arg	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys
			260						265					270	
Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
		275							280					285	
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	290					295					300				
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
305					310					315					320
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn
				325						330					335
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg
			340						345						350
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val
		355							360						365
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser
	370					375						380			
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys
385					390					395					400
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
				405					410						415
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe
			420						425					430	
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu
			435						440					445	
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe
450						455					460				
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly
465						470					475				480
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr
				485					490						495
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser
			500					505						510	
Gly	Ala	Pro	Gln	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys
		515						520						525	
Pro	Ser	Gln	Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile
530						535								540	
Thr	Ser	Asp	Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys
545						550				555					560
Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Tyr	Asn
				565						570					575
Pro	Ser	Leu	Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn
			580						585						590
Gln	Phe	Phe	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr
	595					600						605			
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Met
610						615						620			
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
625						630						635			640
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met
				645								650			655
Thr	Gln	Ser	Pro	Lys	Ser	Met	Ser	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Thr
			660						665					670	
Leu	Asn	Cys	Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Thr	Tyr	Ile	Ser	Trp	Tyr

	675		680		685														
Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser				
	690					695					700								
Asn	Arg	Tyr	Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala				
705					710						715				720				
Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala				
				725					730					735					
Asp	Tyr	His	Cys	Gly	Gln	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly				
			740					745					750						
Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly										
	755						760												

<210> 29
 <211> 761
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

<404> 29

Met	His	Arg	Pro	Arg	Arg	Arg	Gly	Thr	Arg	Pro	Pro	Pro	Leu	Ala	Leu				
1				5					10					15					
Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ala	Arg	Gly	Ala	Asp	Ala	Gly	Ala	Pro				
			20					25					30						
Gln	Val	Lys	Leu	Glu	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln				
		35					40					45							
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Ser	Asp				
	50					55					60								
Tyr	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Lys	Leu	Glu	Trp				
65					70					75					80				
Met	Gly	Tyr	Ile	Asn	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu				
				85					90					95					
Lys	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Phe				
			100					105					110						
Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Val	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys				
		115					120					125							
Ala	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	Tyr	Asn	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Tyr	Trp				
	130						135				140								
Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly				
145					150					155					160				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser				
				165					170					175					
Pro	Lys	Ser	Met	Ser	Met	Ser	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Thr	Leu	Asn	Cys				
			180					185					190						
Lys	Ala	Ser	Glu	Asn	Val	Gly	Thr	Tyr	Ile	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys				
			195				200					205							
Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Asn	Arg	Tyr				
	210					215					220								
Pro	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	Thr	Asp	Phe				
225					230					235					240				
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Glu	Asp	Leu	Ala	Asp	Tyr	His				
				245					250					255					
Cys	Gly	Gln	Gly	Tyr	Thr	Tyr	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu				
			260					265					270						
Glu	Leu	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys				
		275					280					285							
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro				
	290					295					300								
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys				

```

305              310              315              320
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
          325          330
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          340          345          350
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          355          360          365
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          370          375          380
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
385          390          395          400
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
          405          410          415
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
          420          425          430
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
          435          440          445
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
450          455          460
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
465          470          475          480
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
          485          490          495
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
          500          505          510
Ala Pro Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro
          515          520          525
Ser Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
530          535          540
Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu
545          550          555          560
Glu Trp Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Pro
          565          570          575
Ser Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln
          580          585          590
Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr
          595          600          605
Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp
610          615          620
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly
625          630          635          640
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr
          645          650          655
Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu
          660          665          670
Asn Cys Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr Ile Ser Trp Tyr Gln
          675          680          685
Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn
690          695          700
Arg Tyr Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr
705          710          715          720
Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp
          725          730          735
Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr Thr Tyr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
          740          745          750
Lys Leu Glu Leu Lys Arg Gly Pro Gly
          755          760

```

<210> 30
<211> 730

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Sintética

5 <400> 30
 Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gly Ala Pro
 20 25 30
 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 35 40 45
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 50 55 60
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 65 70 75 80
 Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 85 90 95
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 100 105 110
 Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ala Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 115 120 125
 Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Asn Tyr Tyr Gly Met Asp Tyr Trp
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 145 150 155 160
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser
 165 170 175
 Pro Lys Ser Met Ser Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Asn Cys
 180 185 190
 Lys Ala Ser Glu Asn Val Gly Thr Tyr Ile Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
 195 200 205
 Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr
 210 215 220
 Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe
 225 230 235 240
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His
 245 250 255
 Cys Gly Gln Gly Tyr Thr Tyr Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 260 265 270
 Glu Leu Lys Arg Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 275 280 285
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 290 295 300
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 305 310 315 320
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 325 330 335
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 340 345 350
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 355 360 365
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 370 375 380
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 385 390 395 400
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 405 410 415
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 420 425 430

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 435 440 445
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 450 455 460
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 465 470 475 480
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 485 490 495
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 500 505 510
 Ala Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala Gly Phe Asn Lys
 515 520 525
 Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro Glu Pro Lys Lys
 530 535 540
 Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp Thr Val Ile Gln
 545 550 555 560
 His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly Trp Lys Glu Tyr
 565 570 575
 Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp Leu Gly Asn Glu
 580 585 590
 Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met Leu Arg Ile Glu
 595 600 605
 Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln Tyr Asp Arg Phe
 610 615 620
 His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr Leu Lys Gly His
 625 630 635 640
 Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu His Gly Ala Asp
 645 650 655
 Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met Cys Lys Cys Ala
 660 665 670
 Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn
 675 680 685
 Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His Gly Lys Leu Asn
 690 695 700
 Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr Ser Leu Arg Ser
 705 710 715 720
 Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe
 725 730

<210> 31
 <211> 730
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

<400> 31
 Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Pro Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Asp Ala Gly Ala Pro
 20 25 30
 Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 35 40 45
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp
 50 55 60
 Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 65 70 75 80
 Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Ile Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu
 85 90 95
 Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

Phe Val Ser Gln Leu Thr Asn Gln Gln Arg Tyr Val Leu Lys Ile His
 595 600 605
 Leu Lys Asp Trp Glu Gly Asn Glu Ala Tyr Ser Leu Tyr Glu His Phe
 610 615 620
 Tyr Leu Ser Ser Glu Glu Leu Asn Tyr Arg Ile His Leu Lys Gly Leu
 625 630 635 640
 Thr Gly Thr Ala Gly Lys Ile Ser Ser Ile Ser Gln Pro Gly Asn Asp
 645 650 655
 Phe Ser Thr Lys Asp Gly Asp Asn Asp Lys Cys Ile Cys Lys Cys Ser
 660 665 670
 Gln Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys Gly Pro Ser Asn
 675 680 685
 Leu Asn Gly Met Tyr Tyr Pro Gln Arg Gln Asn Thr Asn Lys Phe Asn
 690 695 700
 Gly Ile Lys Trp Tyr Tyr Trp Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Leu Lys Ala
 705 710 715 720
 Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Ala Asp Phe
 725 730

- <210> 32
- <211> 8
- <212> PRT
- 5 <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Sintética
- <400> 32
- Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Pro
- 1 , 5
- 10 <210> 33
- <211> 27
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 15 <223> Cebadores
- <400> 33
- atagaaagat gggggtgctg tttggc 27
- <210> 34
- <211> 21
- 20 <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- <223> Cebadores
- <400> 34
- 25 ggatacagtt ggtgcagcat c 21
- <210> 35
- <211> 39
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
- <223> Cebadores
- <400> 35
- gggatatcc accatggrat gsagctgkgt matsctct 39
- <210> 36
- 35 <211> 39

	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
5	<400> 36 ggggatatcc accatgract tcgggytgag ctkggtttt	39
	<210> 37	
	<211> 38	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
	<400> 37 ggggatatcc accatggctg tcttggggct gctcttct	38
15	<210> 38	
	<211> 39	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
20	<223> Cebadores	
	<400> 38 ggggatatcc accatggatt tcaggtgca gatttcag	39
	<210> 39	
25	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
30	<400> 39 ggggatatcc accatgragt cacakacyca ggtcttyrta	40
	<210> 40	
	<211> 40	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
35	<229>	
	<223> Cebadores	
	<400> 40 ggggatatcc accatgaggk ccccwgtca gtyctkggr	40
	<210> 41	
40	<211> 37	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia Artificial	
	<220>	
	<223> Cebadores	
45	<400> 41 ggggatatcc accatgaagt tgcttgtag gctgttg	37
	<210> 42	
	<211> 43	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia Artificial	

<220>
 <223> Cebadores

 <400> 42
 gatcggcgcg cctgatgtgc agctggtgga gtctggggga ggc 43

 5 <210> 43
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 10 <223> Cebadores

 <400> 43
 gccggagccc ccgcccccg aacctccacc tctgaggag acggtgactg aggttccttg 60
 acc 63

 <210> 44
 <211> 63
 15 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 <400> 44
 tccggggcgc ggggctcccg cggaggtgga tcagacatcc agatgactca gtctccagcc 60
 tcc 63

 20 <210> 45
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 25 <223> Cebadores

 <400> 45
 cgatgcggcc gctcagccc ggccccgtt gattccagc ttggtccte cacc 54

 30 <210> 46
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 35 <400> 46
 gatcggcgcg cctgaagtga agctggtgga gtctggggga ggc 43

 <210> 47
 <211> 63
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia Artificial

 <220>
 <223> Cebadores

 <440> 47
 gccggagccc ccgcccccg aacctccacc tctgaggag acggtgactg aggttccttg 60
 acc 63

 45 <210> 48
 <211> 63
 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Cebadores

<400> 48

tccggggggcg ggggctccgg cggagggtgga tcagatatcc agatgacaca gactacatcc 60
tcc 63

5

<210> 49

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10

<220>

<223> Cebadores

<400> 49

cgatcgggcc gtcagcccg ggccccgttt tattccagc ttggcccc ctcc 54

15

<210> 50

<211> 734

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Sintética

20

<400> 50

Gly	Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
1				5				10						15	
Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
			20					25					30		
Ser	Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu
		35					40					45			
Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala
	50					55					60				
Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn
	65				70					75				80	
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met
				85					90					95	

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Tyr Asp Arg Gly Tyr Tyr Ala Ile
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 130 135 140
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr
 165 170 175
 Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Gly Ala Thr
 180 185 190
 Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly
 210 215 220
 Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 340 345 350
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 370 375 380
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 385 390 395 400
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 405 410 415
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 420 425 430
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 435 440 445
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 450 455 460
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly
 465 470 475 480
 Gly Gly Ser Gly Ala Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 485 490 495
 Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 500 505 510
 Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu
 515 520 525
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile
 530 535 540
 Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 545 550 555 560
 Pro Lys Asn Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp
 565 570 575
 Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Tyr Asp Arg Gly Tyr

```

                    580                      585                      590
Tyr Ala Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
                    595                      600                      605
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp
610                      615                      620
Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu
625                      630                      635                      640
Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu
645                      650                      655
Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
660                      665                      670
Gly Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
675                      680                      685
Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu
690                      695                      700
Asp Phe Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr
705                      710                      715                      720
Leu Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Pro Gly
725                      730

```

<210> 51
 <211> 731
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

```

<400> 51
Gly Ala Pro Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
1 5 10 15
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
20 25 30
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
50 55 60
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
65 70 75 80
Asn Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu
85 90 95
Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Arg Tyr Asp Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly
115 120 125
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr
130 135 140
Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys
145 150 155 160
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
165 170 175
Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ile Ser Arg Leu His
180 185 190
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr
195 200 205
Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe
210 215 220
Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
225 230 235 240
Leu Glu Ile Lys Arg Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

```

				245					250					255					
Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro				
			260					265					270						
Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr				
		275					280					285							
Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn				
	290					295				300									
Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg				
305					310					315					320				
Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val				
				325					330						335				
Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser				
			340				345					350							
Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys				
		355					360					365							
Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Ser	Arg	Asp					
		370				375					380								
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe				
385					390					395					400				
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu				
				405					410						415				
Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe				
			420					425					430						
Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly				
		435					440					445							
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr				
	450					455					460								
Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser				
465					470					475					480				
Gly	Ala	Pro	Asp	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln				
				485					490						495				
Pro	Gly	Gly	Ser	Arg	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe				
			500					505					510						
Ser	Ser	Phe	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Glu	Lys	Gly	Leu				
		515					520					525							
Glu	Trp	Val	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Tyr	Tyr	Ala				
	530					535					540								
Asp	Thr	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn				
545					550					555					560				
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met				
				565					570						575				
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Ile				
		580					585								590				
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly				
		595					600					605							
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met				
	610					615						620							
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr				
625					630						635				640				
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr				
				645					650						655				
Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Thr				
		660						665							670				
Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly				
		675					680								685				
Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly				
	690					695						700							
Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Trp	Thr	Leu	Gly	Gly				
705					710						715				720				
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly									
				725						730									

<210> 52
 <211> 702

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

5 <400> 52
 Gly Ala Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 1 5 10 15
 Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 20 25 30
 Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala
 50 55 60
 Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn
 65 70 75 80
 Thr Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
 85 90 95
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Tyr Asp Tyr Asp Arg Gly Tyr Tyr Ala Ile
 100 105 110
 Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln Met
 130 135 140
 Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr
 145 150 155 160
 Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr
 165 170 175

 Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr Gly Ala Thr
 180 185 190
 Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 195 200 205
 Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Gly
 210 215 220
 Ser Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr Leu Gly Gly
 225 230 235 240
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285
 Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 290 295 300
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 305 310 315 320
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 325 330 335
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 340 345 350
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 355 360 365
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 370 375 380
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val


```

385          390          395          400
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
      405          410          415
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
      420          425          430
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
      435          440          445
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
      450          455          460
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Gly Gly
      465          470          475          480
Gly Gly Ser Gly Ala Pro Phe Arg Asp Cys Ala Asp Val Tyr Gln Ala
      485          490          495
Gly Phe Asn Lys Ser Gly Ile Tyr Thr Ile Tyr Ile Asn Asn Met Pro
      500          505          510
Glu Pro Lys Lys Val Phe Cys Asn Met Asp Val Asn Gly Gly Gly Trp

      515          520          525
Thr Val Ile Gln His Arg Glu Asp Gly Ser Leu Asp Phe Gln Arg Gly
      530          535          540
Trp Lys Glu Tyr Lys Met Gly Phe Gly Asn Pro Ser Gly Glu Tyr Trp
      545          550          555          560
Leu Gly Asn Glu Phe Ile Phe Ala Ile Thr Ser Gln Arg Gln Tyr Met
      565          570          575
Leu Arg Ile Glu Leu Met Asp Trp Glu Gly Asn Arg Ala Tyr Ser Gln
      580          585          590
Tyr Asp Arg Phe His Ile Gly Asn Glu Lys Gln Asn Tyr Arg Leu Tyr
      595          600          605
Leu Lys Gly His Thr Gly Thr Ala Gly Lys Gln Ser Ser Leu Ile Leu
      610          615          620
His Gly Ala Asp Phe Ser Thr Lys Asp Ala Asp Asn Asp Asn Cys Met
      625          630          635          640

Cys Lys Cys Ala Leu Met Leu Thr Gly Gly Trp Trp Phe Asp Ala Cys
      645          650          655
Gly Pro Ser Asn Leu Asn Gly Met Phe Tyr Thr Ala Gly Gln Asn His
      660          665          670
Gly Lys Leu Asn Gly Ile Lys Trp His Tyr Phe Lys Gly Pro Ser Tyr
      675          680          685
Ser Leu Arg Ser Thr Thr Met Met Ile Arg Pro Leu Asp Phe
      690          695          700

```

<210> 53
 <222> 702
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Sintética

```

<400> 53
Gly Ala Pro Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
  1          5          10          15
Pro Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      20          25          30
Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu
      35          40          45
Glu Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Ser Asn Ile Tyr Tyr Ala
      50          55          60
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn

```

65					70					75					80
Thr	Leu	Phe	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met
				85					90					95	
Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Asp	Arg	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Ile
			100					105					110		
Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly
		115					120					125			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Ile	Gln	Met
	130					135					140				
Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Thr	Val	Thr
145					150					155					160
Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Asn	Ile	Tyr	Ser	Asn	Leu	Ala	Trp	Tyr
			165						170					175	
Gln	Gln	Lys	Gln	Gly	Lys	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Val	Tyr	Gly	Ala	Thr
			180					185					190		
Asn	Leu	Ala	Asp	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly
		195					200					205			
Thr	Gln	Tyr	Ser	Leu	Lys	Ile	Asn	Ser	Leu	Gln	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly
	210					215					220				
Ser	Tyr	Tyr	Cys	Gln	His	Phe	Trp	Gly	Thr	Pro	Trp	Thr	Leu	Gly	Gly
225				230						235					240
Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	Gly	Pro	Gly	Asp	Lys	Thr	His	Thr
				245				250						255	
Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
			260				265						270		
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
		275				280					285				
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val
	290					295					300				
Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr
305					310				315						320
Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val
			325						330					335	
Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys
			340					345					350		
Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser
		355					360					365			
Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro
	370					375					380				
Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val
385					390						395				400
Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly
				405				410						415	
Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
			420					425					430		
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp
		435					440					445			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His
	450					455					460				
Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	Gly	Gly
465					470						475				480
Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Pro	Phe	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Val	Phe	Lys	Ser
			485					490						495	
Gly	His	Thr	Thr	Asn	Gly	Ile	Tyr	Thr	Leu	Thr	Phe	Pro	Asn	Ser	Thr
			500					505					510		
Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Tyr	Cys	Asp	Met	Glu	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly	Trp
		515					520					525			
Thr	Ile	Ile	Gln	Arg	Arg	Glu	Asp	Gly	Ser	Val	Asp	Phe	Gln	Arg	Thr
	530					535						540			
Trp	Lys	Glu	Tyr	Lys	Val	Gly	Phe	Gly	Asn	Pro	Ser	Gly	Glu	Tyr	Trp
545					550						555				560

Leu	Gly	Asn	Glu	Phe	Val	Ser	Gln	Leu	Thr	Asn	Gln	Gln	Arg	Tyr	Val
				565					570					575	
Leu	Lys	Ile	His	Leu	Lys	Asp	Trp	Glu	Gly	Asn	Glu	Ala	Tyr	Ser	Leu
			580					585					590		
Tyr	Glu	His	Phe	Tyr	Leu	Ser	Ser	Glu	Glu	Leu	Asn	Tyr	Arg	Ile	His
		595					600					605			
Leu	Lys	Gly	Leu	Thr	Gly	Thr	Ala	Gly	Lys	Ile	Ser	Ser	Ile	Ser	Gln
	610					615					620				
Pro	Gly	Asn	Asp	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Gly	Asp	Asn	Asp	Lys	Cys	Ile
625					630					635					640
Cys	Lys	Cys	Ser	Gln	Met	Leu	Thr	Gly	Gly	Trp	Trp	Phe	Asp	Ala	Cys
				645					650					655	
Gly	Pro	Ser	Asn	Leu	Asn	Gly	Met	Tyr	Tyr	Pro	Gln	Arg	Gln	Asn	Thr
			660					665					670		
Asn	Lys	Phe	Asn	Gly	Ile	Lys	Trp	Tyr	Tyr	Trp	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr
		675					680					685			
Ser	Leu	Lys	Ala	Thr	Thr	Met	Met	Ile	Arg	Pro	Ala	Asp	Phe		
	690					695					700				

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un polipéptido de fusión que comprende $(A)_x\text{-M-(A')}_y$, donde A es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo para un receptor Tie diana, A' es un dominio fibrinógeno de un ligando del receptor Tie o uno de sus fragmentos y es capaz de unirse al mismo receptor diana, M es un componente multimerizante, y X e Y son independientemente un número entre 1 y 10; y donde el polipéptido de fusión activa el receptor Tie diana induciendo la fosforilación de dicho receptor en su unión a él.
2. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, donde A' es un dominio fibrinógeno de Ang-1 o Ang-2 o uno de sus fragmentos.
- 10 3. El polipéptido de fusión de la reivindicación 1, donde el receptor Tie es humano, A es un anticuerpo humanizado o un fragmento de anticuerpo, y A' es el dominio fibrinógeno de Ang-1 o Ang-2 humana o uno de sus fragmentos.
4. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde A es un fragmento Fv de cadena sencilla (ScFv).
- 15 5. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde A comprende una región variable de la cadena V_H (residuos 33 a 154) y una región variable de la cadena V_L (residuos 170 a 276) del SEQ ID NO: 30 o A comprende una región ScFv (residuos 33 a 276) del SEQ ID NO: 30.
6. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde X e Y son cada uno 1.
7. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el componente multimerizante es el dominio Fc de IgG.
- 20 8. El polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el receptor diana es un receptor Tie-1 o Tie-2.
9. Un ácido nucleico aislado que codifica un polipéptido de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
10. Un dímero formado por dos de los polipéptidos de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.
- 25 11. Un método de producción de un polipéptido de fusión, que comprende cultivar una célula anfitriona transfectada con un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9, en condiciones adecuadas para la expresión de la proteína procedente de la célula anfitriona, y recuperar la proteína de fusión producida de ese modo.
- 30 12. Una composición farmacéutica que comprende el dímero de la reivindicación 10 y un portador farmacéuticamente aceptable.
13. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 9.
14. Un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico de la reivindicación 9 conectado operablemente a una secuencia de control de la expresión.
- 35 15. Un sistema anfitrión-vector para la producción de polipéptidos de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que comprende un vector de expresión de la reivindicación 14 introducido en una célula anfitriona aislada o un organismo no humano.
16. Un sistema anfitrión-vector de la reivindicación 15 que es un mamífero transgénico no humano.