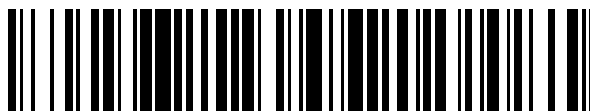


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 373 832**

51 Int. Cl.:
C12N 15/10 (2006.01)
C07K 1/04 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C07K 14/31 (2006.01)
C07K 14/49 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08862011 .7**
96 Fecha de presentación: **17.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231860**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **POLIPÉPTIDO DERIVADO DE PROTEÍNA A Y CAPAZ DE UNIRSE A PDGF.**

30 Prioridad:
19.12.2007 US 2972
21.12.2007 EP 07150394
26.12.2007 US 9171 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
09.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
09.02.2012

73 Titular/es:
AFFIBODY AB
BOX 20137
161 02 BROMMA, SE

72 Inventor/es:
LINDBORG, Malin;
GUNNERIUSSON, Elin y
LENDEL, Christofer

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 373 832 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

Polipéptido derivado de proteína A y capaz de unirse a PDGF.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a polipéptidos que se unen a receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-R β). También se refiere a nuevos procedimientos y usos de tales polipéptidos en el tratamiento y diagnóstico de diferentes afecciones relacionadas con PDGF- R β .

Antecedentes

10 El receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-R β) es una tirosina quinasa que atraviesa la membrana. El ligando de PDGF se compone de combinaciones de las cadenas homólogas A, B, C y D, combinadas con homo o heterodímeros. PDGF-R β se une a PDGF-BB con alta afinidad y PDGF-AB con baja afinidad. La unión a ligando conduce a dimerización y transfosforilación de tirosinas en el dominio quinasa intracelular de los receptores.

15 PDGF es un factor importante para regular la proliferación celular, diferenciación celular, crecimiento celular y desarrollo. PDGF-R β está implicado en angiogénesis y en las etapas tempranas de fibrosis. Este receptor representa unan diana atractiva y potencialmente valiosa, por ejemplo para el tratamiento y formación de imágenes moleculares en por ejemplo enfermedades oncológicas y fibróticas.

20 Están en desarrollo clínico anticuerpos que bloquean el efecto de PDGF-R β y la provisión continuada de agentes con una afinidad comparable por este receptor sigue siendo un tema de interés sustancial dentro del campo. También es de gran interés la provisión de usos de tales moléculas en el tratamiento y diagnóstico de enfermedad. Es un objeto de la invención proporcionar nuevos agentes de unión a PDGF-R β , que podrían por ejemplo usarse para diagnóstico, formación de imágenes *in vitro* o *in vivo* y aplicaciones terapéuticas.

Sumario de la invención

25 De acuerdo con un aspecto de la invención, se proporciona un polipéptido de unión a receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-R β), que comprende un motivo de unión a receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta, *PBM*, consistiendo dicho motivo en una secuencia de aminoácidos seleccionada de

- i) EX₂X₃X₄AAAX₇EID X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QW NAFIX₂₅X₂₆LX₂₈X₂₉,
 en la que, de forma independiente entre sí,
 X₂ se selecciona de L, R y I;
 X₃ se selecciona de R, I, L, V, K, Q, S, H, y A;
 30 X₄ se selecciona de A, R, N, D, Q, E, H, K, M, S, T, W, F y V;
 X₇ se selecciona de A, R, D, Q, E, G, K y S;
 X₁₁ se selecciona de A, R, N, D, E, G, K, S, T y Q;
 X₁₆ se selecciona de N y T;
 X₁₇ se selecciona de R y K;
 35 X₁₈ se selecciona de A, R, N, D, C, Q, E, G, L, K, M, S, T, W y V;
 X₂₅ se selecciona de K, R, Q, H, S, G y A;
 X₂₆ se selecciona de S y K;
 X₂₈ se selecciona de V, R, I, L y A;
 X₂₉ se selecciona de D y K; y
 40 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia definida en i),

y en la que el polipéptido de unión a PDGF-R β se une a PDGF-R β tal de modo que el valor K_D de la interacción es como máximo 1 x 10⁻⁶ M.

45 La definición anterior de una clase de polipéptidos de unión a PDGF-R β relacionados con secuencia de acuerdo con la invención se basa en un análisis de varias variantes polipeptídicas aleatorias de un armazón parental, que se seleccionaron por su interacción con PDGF-R β en experimentos de selección. El motivo de unión a PDGF-R β identificado, o "*PBM*", corresponde a la región de unión a diana del armazón parental, constituyendo dicha región dos hélices alfa dentro de un dominio proteico de conjunto de tres hélices. En el armazón parental, los restos aminoacídicos variados de las dos hélices *PBM* constituyen una superficie de unión para interacción con la parte Fc constante de anticuerpos. En la presente invención, la variación aleatoria de restos de superficie de unión y la selección posterior de variantes han reemplazado la capacidad de interacción con Fc con una capacidad de interacción con PDGF-R β .

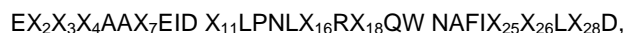
50 Como entenderá el experto en la materia, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión de PDGF-R β de los polipéptidos de acuerdo con la invención, depende de la estructura terciaria del polipéptido. Es por lo tanto posible realizar pequeños cambios en la secuencia de aminoácidos en un polipéptido sin afectar a la función

del mismo. Por lo tanto, la invención abarca variantes modificadas del *PBM* de i), que son tales que la secuencia resultante es la menos 90 % idéntica a una secuencia que pertenece a la clase definida por i), tal como al menos 93 % idéntica, tal como al menos 97 % idéntica. Por ejemplo, es posible que un resto aminoacídico que pertenezca a un cierto grupo funcional de restos aminoacídicos (por ejemplo, hidrófobo, hidrófilo, polar, etc.) pudiera intercambiarse con otro resto aminoacídico del mismo grupo funcional.

- 5 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{17} es R.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{11} se selecciona de A, R, N, D, E, G, K, S y T.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_2 se selecciona de L y R.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_3 se selecciona de R, I, L, V y S.
- 10 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_4 se selecciona de A, R, N, D, Q, E, H, K, M, S, T y W.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{25} se selecciona de K, R, Q, H y S.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{28} se selecciona de V, R, I y L.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{29} es D.
- 15 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{25} es K.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{28} es V.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_3 se selecciona de I y V.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_4 se selecciona de A, R, E y K.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_7 se selecciona de A, R y E.
- 20 En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{11} se selecciona de A, R, N y E.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_{18} se selecciona de R, E, K y V.
- En una realización del polipéptido de acuerdo con la invención, X_2 es L.

25 Como se describe en detalle en la sección experimental a continuación, la selección de variantes de unión a PDGF-R β ha conducido a la identificación de secuencias de motivo de unión a PDGF-R β (*PBM*) individuales. Estas secuencias constituyen realizaciones individuales de la secuencia de *PBM* i) en la definición de polipéptidos de unión a PDGF-R β de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Las secuencias de motivos de unión a PDGF-R β individuales se presentan en la Figura 1 y como SEC ID N $^{\circ}$: 1-179. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, la secuencia de *PBM* i) se selecciona de una cualquiera de SEC ID N $^{\circ}$: 2-3, SEC ID N $^{\circ}$: 5, SEC ID N $^{\circ}$: 7, SEC ID N $^{\circ}$: 11-12, SEC ID N $^{\circ}$: 18-19, SEC ID N $^{\circ}$: 38, SEC ID N $^{\circ}$: 42, SEC ID N $^{\circ}$: 44, SEC ID N $^{\circ}$: 47, SEC ID N $^{\circ}$: 60-62, SEC ID N $^{\circ}$: 64, SEC ID N $^{\circ}$: 67-68, SEC ID N $^{\circ}$: 71-72, SEC ID N $^{\circ}$: 78, SEC ID N $^{\circ}$: 80-81, SEC ID N $^{\circ}$: 83, SEC ID N $^{\circ}$: 86, SEC ID N $^{\circ}$: 91-92, SEC ID N $^{\circ}$: 94-97, SEC ID N $^{\circ}$: 101-103, SEC ID N $^{\circ}$: 105, SEC ID N $^{\circ}$: 109, SEC ID N $^{\circ}$: 111, SEC ID N $^{\circ}$: 116, SEC ID N $^{\circ}$: 119, SEC ID N $^{\circ}$: 133, SEC ID N $^{\circ}$: 137, SEC ID N $^{\circ}$: 139-140, SEC ID N $^{\circ}$: 149, SEC ID N $^{\circ}$: 153, SEC ID N $^{\circ}$: 160, SEC ID N $^{\circ}$: 164, SEC ID N $^{\circ}$: 170, SEC ID N $^{\circ}$: 174 y SEC ID N $^{\circ}$: 179.

35 En una realización, el polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención comprende un motivo de unión a receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta, *PBM*, consistiendo dicho motivo en la secuencia de aminoácidos seleccionada de



en la que, independientemente entre sí,

- 40 X_2 se selecciona de L y R;
 X_3 se selecciona de R, I, L, V, Q y S;
 X_4 se selecciona de A, R, D, E, K y V;
 X_7 se selecciona de A, Q y K;
 X_{11} se selecciona de A, R, E y S;
 X_{16} se selecciona de N y T;
- 45 X_{18} se selecciona de R, G, K, S, T y V;
 X_{25} se selecciona de K, R, S y A;
 X_{26} se selecciona de S y K;
 X_{28} se selecciona de V, R, I y A.

La secuencia de aminoácidos del *PBM* puede por ejemplo seleccionarse de una cualquiera de SEC ID N°: 2-3, SEC ID N°: 5, SEC ID N°: 7, SEC ID N°: 11, SEC ID N°: 60, SEC ID N°: 72, SEC ID N°: 78, SEC ID N°: 111 y SEC ID N°: 153.

5 En realizaciones particulares de la presente invención, el *PBM* forma parte de un dominio proteico de conjunto de tres hélices. Por ejemplo, el *PBM* puede constituir esencialmente dos hélices alfa con un bucle de interconexión, dentro de dicho dominio proteico de conjunto de tres hélices. En estas realizaciones, el polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención puede comprender en particular una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

i) K-[*PBM*]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLNDX_dQ;

10 en la que

[*PBM*] es un motivo de unión a PDGF-R β como se ha definido anteriormente;

X_a se selecciona de A y S;

X_b se selecciona de N y E;

X_c se selecciona de A y S;

15 X_d se selecciona de A y S;

y

ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con una cualquiera de las secuencias definidas anteriormente.

20 Dicha secuencia de aminoácidos puede tener al menos 82 %, tal como al menos 84 %, tal como al menos 86 %, tal como al menos 88 %, tal como al menos 90 %, tal como al menos 92 %, tal como al menos 94 %, tal como al menos 96 %, tal como al menos 98 % de identidad con las secuencias definidas anteriormente. La secuencia de aminoácidos puede por ejemplo seleccionarse de SEC ID N°: 180-358. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos i) puede seleccionarse de una cualquiera de SEC ID N°: 181-182, SEC ID N°: 184, SEC ID N°: 186, SEC ID N°: 190-191, SEC ID N°: 197-198, SEC ID N°: 217, SEC ID N°: 221, SEC ID N°: 223, SEC ID N°: 226, SEC ID N°: 239-241, SEC ID N°: 243, SEC ID N°: 246-247, SEC ID N°: 250-251, SEC ID N°: 257, SEC ID N°: 259-260, SEC ID N°: 262, SEC ID N°: 265, SEC ID N°: 270-271, SEC ID N°: 273-276, SEC ID N°: 280-282, SEC ID N°: 284, SEC ID N°: 288, SEC ID N°: 290, SEC ID N°: 295, SEC ID N°: 298, SEC ID N°: 312, SEC ID N°: 316, SEC ID N°: 318-319, SEC ID N°: 328, SEC ID N°: 332, SEC ID N°: 339, SEC ID N°: 343, SEC ID N°: 343, SEC ID N°: 349, SEC ID N°: 353 y SEC ID N°: 358, y puede en particular seleccionarse de una cualquiera de SEC ID N°: 181-182, SEC ID N°: 184, SEC ID N°: 186, SEC ID N°: 190, SEC ID N°: 239, SEC ID N°: 251, SEC ID N°: 257, SEC ID N°: 290, SEC ID N°: 332 y SEC ID N°: 358.

En realizaciones particulares de la invención dicho dominio proteico de conjunto de tres hélices se selecciona de dominios de proteínas receptoras bacterianas. Son ejemplos no limitantes de tales dominios los cinco dominios de tres hélices diferentes de proteína A de *Staphylococcus aureus* y derivados de los mismos.

35 Por lo tanto, un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

ADNNFNK-[*PBM*]-DPSQSANLLSEAKKLNESQAPK (*PBM* dentro del dominio A de proteína A estafilocócica);

40 ADNKFNK-[*PBM*]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK (*PBM* dentro del dominio B de proteína A estafilocócica);

ADNKFNK-[*PBM*]-DPSVSKEILAEAKKLNDQAQAPK (*PBM* dentro del dominio C de proteína A estafilocócica);

ADAQQNNFNK-[*PBM*]-DPSQSTNVLGEAKKLNESQAPK (*PBM* dentro del dominio D de proteína A estafilocócica);

45 AQHDE-[*PBM*]-DPSQSANVLGEAQLNDSQAPK (*PBM* dentro del dominio E de proteína A estafilocócica);

VDNKFNK-[*PBM*]-DPSQSANLLAEAKKLNDQAQAPK (*PBM* dentro del derivado de proteína Z del dominio B de proteína A estafilocócica);

VDAKFAK-[*PBM*]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPK (*PBM* dentro de una variante de un derivado de proteína Z del dominio B de la proteína A estafilocócica);

50 AEAKYAK-[*PBM*]-DPSQSSELLSEAKKLNDSQAPS (*PBM* dentro de una variante de un derivado de proteína Z del dominio B de la proteína A estafilocócica); y una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con una cualquiera de las secuencias definidas anteriormente y en la que [*PBM*]

es un motivo de unión a PDGF-R β como se ha definido anteriormente. El polipéptido de la invención puede por ejemplo tener una secuencia que es al menos 81 %, al menos 83 %, al menos 84 %, al menos 86 %, al menos 88 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 93 %, al menos 95 %, al menos 97 % o al menos 98 % idéntica a la secuencia descrita en el presente documento. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, dicha secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada de una cualquiera

55 de SEC ID N°: 359-537. La secuencia de aminoácidos puede por ejemplo comprender una secuencia seleccionada de SEC ID N°: 360-361, SEC ID N°: 363, SEC ID N°: 365, SEC ID N°: 369-370, SEC ID N°: 376-377, SEC ID N°: 396, SEC ID N°: 400, SEC ID N°: 402, SEC ID N°: 405, SEC ID N°: 418-420, SEC ID N°: 422, SEC ID N°: 425-426, SEC ID N°: 429-430, SEC ID N°: 436, SEC ID N°: 438-439, SEC ID N°: 441, SEC ID N°: 444, SEC ID N°: 449-450, SEC ID N°: 452-455, SEC ID N°: 459-461, SEC ID N°: 463, SEC ID

Nº: 467, SEC ID Nº: 469, SEC ID Nº: 474, SEC ID Nº: 477, SEC ID Nº: 491, SEC ID Nº: 495, SEC ID Nº: 497-498, SEC ID Nº: 507, SEC ID Nº: 511, SEC ID Nº: 518, SEC ID Nº: 522, SEC ID Nº: 528, SEC ID Nº: 532 y SEC ID Nº: 537, y puede en particular comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC ID Nº: 360-361, SEC ID Nº: 363, SEC ID Nº: 365, SEC ID Nº: 369, SEC ID Nº: 418, SEC ID Nº: 430, SEC ID Nº: 436, SEC ID Nº: 469, SEC ID Nº: 511 y SEC ID Nº: 537.

Un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con cualquier aspecto de la invención puede unirse a PDGF-R β de modo que el valor K_D de la interacción es como máximo 1×10^{-7} M, por ejemplo como máximo 1×10^{-8} M.

Los polipéptidos de acuerdo con la invención son ventajosos porque se unen bien a PDGF-R β . Los polipéptidos pueden en particular unirse al dominio extracelular de PDGF-R β . Típicamente, los polipéptidos pueden ser relativamente cortos. En virtud de su tamaño pequeño, se espera que muestren una penetración más eficaz en tejido tumoral que los anticuerpos, así como que tengan mejores propiedades de circulación sistémica que los anticuerpos monoclonales (que con frecuencia tienen tiempos de circulación demasiado largos). Por lo tanto, se consideran candidatos adecuados para el desarrollo de agentes de formación de imágenes moleculares. Las posibles aplicaciones adicionales incluyen el uso en desarrollo de fármacos y en procedimientos de exploración cuando se desean agentes de formación de imágenes específicos para medir el resultado de tratamiento de modelos *in vivo* y posteriormente durante el desarrollo clínico. La formación de imágenes moleculares proporciona una eficacia de lectura directa de un agente farmacéutico dirigido a regular negativamente un receptor de factor de crecimiento, así como para evaluar el efecto antitumoral.

El experto en la materia apreciará que pueden realizarse diversas modificaciones y/o adiciones a un polipéptido de acuerdo con la invención para adaptar el polipéptido a una aplicación específica sin separarse del alcance de la presente invención. Por ejemplo, un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con cualquier aspecto de la invención puede extenderse por aminoácidos C terminales y/o N terminales. Dicho polipéptido extendido es un polipéptido que tiene restos aminoacídicos adicionales en la primera y/o la última posición de la cadena polipeptídica, es decir en el extremo N y/o C terminal. El polipéptido puede extenderse por cualquier número adecuado de restos aminoacídicos adicionales, por ejemplo al menos un resto aminoacídico. Cada resto aminoacídico adicional puede añadirse individualmente o en conjunto para, por ejemplo, mejorar la producción, purificación, estabilización *in vivo* o *in vitro*, acoplamiento o detección del polipéptido. Tales restos aminoacídicos adicionales pueden comprender uno o más restos aminoacídicos añadidos para el fin de acoplamiento químico. Un ejemplo de esto es la adición de un resto de cisteína. Tales restos aminoacídicos adicionales también pueden proporcionar un "marcador" para purificación o detección del polipéptido tal como un marcador His₆ o un marcador "myc" (c-myc) o un marcador "FLAG" para interacción con anticuerpos específicos para el marcador.

Las extensiones de aminoácidos analizadas anteriormente también pueden proporcionar uno o más dominios polipeptídicos con cualquier función deseada, tal como la misma función de unión que el primer dominio de unión a PDGF-R β , u otra función de unión o una función enzimática, función tóxica (por ejemplo una inmunotoxina) o una función de señalización fluorescente o combinaciones de las mismas. En un polipéptido extendido tal de acuerdo con la invención, un polipéptido de unión a PDGF-R β como se ha descrito anteriormente está presente como un dominio de unión a PDGF-R β al que se acoplan péptido o proteínas adicionales u otros grupos funcionales en el extremo N y/o C terminal o a cualquier otro resto (específicamente o no específicamente). Un ejemplo es una extensión de aminoácidos que comprende el dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína estreptocócica G o un derivado del mismo. Un polipéptido extendido con ABD tal se une a albúmina de suero *in vivo* y se beneficia de su semivida más larga, que aumenta la semivida neta del polipéptido en sí mismo (véase por ejemplo el documento WO91/01743). Como alternativa, la extensión de aminoácidos puede comprender cualquier otro polipéptido con afinidad por una proteína del suero.

También se abarcan por la presente invención modificaciones y/o adiciones al polipéptido de la invención tales como marcadores y/o agentes terapéuticos que se conjugan químicamente o se unen de otro modo al polipéptido.

Las extensiones, modificaciones y adiciones de aminoácidos como se ha analizado anteriormente pueden acoplarse al polipéptido de la invención por medio de conjugación química (usando procedimientos de química orgánica conocidos) o por cualquier otro medio, tal como expresión del polipéptido de acuerdo con la invención como una proteína de fusión.

En una realización específica de la presente invención, el polipéptido se une al mismo epítipo que PDGF-BB, o suficientemente cercano a él para bloquear la unión del ligando PDGF-BB a PDGF-R β . El polipéptido puede por ejemplo usarse para inhibir la señalización celular uniéndose a un PDGF-R β en la superficie celular. Dicho bloqueo de la función receptora puede utilizarse para obtener un efecto terapéutico. Como alternativa, la unión del polipéptido a PDGF-R β puede estimular la activación del receptor proporcionando dimerización del receptor.

En algunas realizaciones de la invención, el polipéptido está presente en forma multimérica, que comprende al menos dos unidades monoméricas polipeptídicas de unión a PDGF-R β , las secuencias de aminoácidos de las cuales pueden ser las mismas o diferentes. Las formas multiméricas del polipéptido pueden ser ventajosas porque pueden tener propiedades de unión potenciadas. Las formas multiméricas preferidas incluyen formas dimericas. Una forma dimerica tal del polipéptido de la invención puede por ejemplo usarse para estimular la activación del receptor.

Las formas multiméricas de los polipéptidos pueden comprender varios dominios adecuados, teniendo cada uno un motivo de unión a PDGF-R β y formando cada uno un “monómero” dentro del multímero. Estos dominios pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos pero, como alternativa, pueden tener diferentes secuencias de aminoácidos. Las unidades monoméricas de un polipéptido multimérico pueden unirse por acoplamiento covalente usando procedimientos de química orgánica conocidos o expresarse como uno o más polipéptidos de fusión, por ejemplo en un sistema para expresión recombinante de polipéptidos o unirse de cualquier otra manera, directamente o mediante un engarce, por ejemplo un engarce de aminoácidos.

En aspectos relacionados de la invención se proporciona un polinucleótido que codifica un polipéptido como se ha descrito anteriormente así como un procedimiento para producir un polipéptido tal, comprendiendo el procedimiento expresión del polinucleótido.

Puede usarse un polipéptido de la invención como una alternativa a anticuerpos convencionales o sustancias de bajo peso molecular en diversas aplicaciones médicas, veterinarias y de diagnóstico. El destinatario experto entenderá que los polipéptidos de la invención pueden ser útiles en cualquier procedimiento que se base en afinidad por PDGF-R β de un reactivo. Por lo tanto, el polipéptido de la invención puede usarse como un reactivo de detección, un reactivo de captura o un reactivo de separación en tales procedimientos, pero también como un agente terapéutico o de diagnóstico en sí mismo o como un medio para dirigir a otros agentes terapéuticos o de diagnóstico, con efectos directos (por ejemplo moléculas tóxicas, toxinas) o indirectos (por ejemplo, vacunas de cáncer, moléculas inmunoestimuladoras) en la proteína de PDGF-R β . Las aplicaciones de diagnóstico incluyen por ejemplo formación de imágenes moleculares para revelar, diagnosticar y examinar la presencia de una enfermedad, tales como un tumor, *in vivo* en el cuerpo de un sujeto mamífero.

En un aspecto de la invención se proporciona por lo tanto un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento, por ejemplo para tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R β . En este caso, el polipéptido de unión a PDGF-R β de la invención se usa *in vivo* para obtener un efecto terapéutico, por ejemplo inhibiendo la señalización celular por unión a un PDGF-R β en una superficie celular. Se proporciona también un polipéptido de unión a PDGF-R β para su uso en diagnóstico, tal como en el diagnóstico de una afección relacionada con PDGF-R β .

En otros aspectos de la invención, los polipéptido de unión a PDGF-R β pueden usarse en la dirección de agentes terapéuticos o de diagnóstico, tanto *in vivo* como *in vitro*, a células que expresan PDGF-R β , particularmente a células que sobreexpresan PDGF-R β . Se proporciona por lo tanto una combinación de un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención y un agente terapéutico. En una realización, dicha combinación se usa como un medicamento, por ejemplo para el tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R β . Se proporciona además, en un aspecto relacionado de la invención, una combinación de un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención y un agente de diagnóstico. Dicha combinación puede usarse en el diagnóstico de una afección relacionada con PDGF-R β , por ejemplo en formación de imágenes moleculares de células que sobreexpresan PDGF-R β . Además del desarrollo de agentes de formación de imágenes moleculares para la clínica, existe una aplicación para agentes de formación de imágenes preclínicas específicos para medir el resultado de tratamiento de modelos *in vivo* y posteriormente durante el desarrollo clínico. La formación de imágenes moleculares debería proporcionar una lectura directa de la eficacia de un agente farmacéutico dirigido a regular negativamente un receptor por ejemplo PDGF-R β , así como para evaluar el efecto antitumoral.

En un aspecto relacionado de la presente invención, se proporciona un procedimiento de tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R β , que comprende administrar un polipéptido de unión a PDGF-R β o combinación como se ha descrito anteriormente a un sujeto mamífero que lo necesite. Por lo tanto, en el procedimiento de tratamiento de la invención, el sujeto se trata con un polipéptido de unión a PDGF-R β o una combinación de acuerdo con la invención. En una realización más específica de dicho procedimiento, dicha unión de dicho polipéptido de unión a PDGF-R β o dicha combinación con un PDGF-R β del sujeto inhibe o estimula la activación del receptor. Dicha unión puede por ejemplo inhibir la señalización del receptor. También se proporciona un procedimiento para diagnóstico de una afección relacionada con PDGF-R β en un sujeto mamífero, que comprende administrar un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la invención o una combinación de diagnóstico como se ha descrito anteriormente, al sujeto para los fines de obtener un diagnóstico.

En realizaciones de los usos y procedimientos de tratamiento anteriormente descritos, dicha afección puede seleccionarse de enfermedad cancerosa, tal como gliomas, sarcomas y leucemias; enfermedades vasculares, tales como aterosclerosis, reestenosis, hipertensión pulmonar y enfermedades retinales; enfermedades fibróticas, tales como fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, esclerodermia, glomeruloesclerosis y fibrosis cardiaca.

Las expresiones “de unión a PDGF-R β ” y “afinidad de unión por PDGF-R β ” como se usan en la presente memoria descriptiva se refieren a una propiedad de un polipéptido que puede ensayarse por ejemplo por el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento Biacore (GE Healthcare). Por ejemplo como se describe en los ejemplos posteriores, la afinidad de unión a PDGF-R β puede ensayarse en un experimento en el que PDGF-R β , o un fragmento de PDGF-R β tal como el dominio extracelular, se inmoviliza en una microplaca sensora

del instrumento y la muestra que contiene el polipéptido a ensayar se pasa sobre la microplaca. Como alternativa, el polipéptido a ensayar se inmoviliza en una microplaca sensora del instrumento y una muestra que contiene PDGF-R β , o fragmento del mismo, se pasa sobre la microplaca. El experto en la materia puede interpretar después los resultados obtenidos por tales experimentos para establecer al menos una medida cualitativa de la unión del polipéptido a PDGF-R β . Si se desea una medida cuantitativa, por ejemplo para determinar un valor K_D para la interacción, también pueden usarse procedimientos de resonancia de plasmón superficial. Los valores de unión pueden por ejemplo definirse en un instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare). PDGF-R β se inmoviliza en una microplaca sensora de la medición y se preparan muestras del polipéptido cuya afinidad va a determinarse por dilución en serie y se inyectan sobre la microplaca. Los valores de K_D pueden después calcularse a partir de los resultados usando por ejemplo el modelo de unión de Langmuir 1:1 del software BIAevaluation 4.1 proporcionado por el fabricante del instrumento. El PDGF-R β o fragmento del mismo puede por ejemplo comprender la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID N°: 540 (domino extracelular de PDGF-R β) o SEC ID N°: 539 (PDGF-R β). Puede usarse por ejemplo el dominio extracelular de PDGF-R β humano recombinante (restos aminoácidos 1-530, Gronwald y col, 1998, PNAS 85) proporcionado por R&D Systems, N° 385-PR/CF.

15 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 es una lista de las secuencias de aminoácidos de los ejemplos de motivos de unión a PDGF-R β comprendidos en polipéptidos de unión a PDGF-R β de la invención (SEC ID N°: 1-179), ejemplos de polipéptidos de unión a PDGF-R β de 49 restos aminoácidos de longitud de acuerdo con la invención (SEC ID N°: 180-358) y ejemplos de polipéptidos de unión a PDGF-R β de 58 restos aminoácidos de longitud de acuerdo con la invención (SEC ID N°: 359-537), así como las secuencias de proteína Z (SEC ID N°: 538), la entrada de Swiss-Prot P09619 de PDGF-R β humano (restos aminoácidos 1-1106, SEC ID N°: 539) y la entrada de Swiss-Prot P09619 del dominio extracelular de PDGF-R β humano (restos aminoácidos 33-531 de PDGF-R β , SEC ID N°: 540).

Las Figuras 2A-C muestran el resultado de análisis de unión realizado en un instrumento de Biacore para investigar la unión de diferentes variantes Z monoméricas a receptores de PDGF. Se inyectaron ocho variantes Z diferentes en duplicados sobre superficies de microplacas Biacore con receptores de PDGF inmovilizados. A) Muestra la inyección sobre PDGF-R β humano, B) muestra la inyección sobre PDGF-R β murino y C) muestra la inyección sobre PDGF-R α humano. Las variantes Z se enumeran en dos grupos, las variantes Z individuales en cada grupo de variante Z que corresponden de arriba a abajo a curvas individuales en cada grupo de curvas. Las Figuras 3A-D muestran el resultado de un ensayo de epitopos de moléculas variantes Z en PDGF-R β . Se inyectaron analitos que contenían diversas concentraciones de moléculas variantes Z y una concentración constante de PDGF-R β sobre PDGF-BB inmovilizado. A) Muestra Z01977, B) muestra Z01980, C) muestra Z01982 y D) muestra un control negativo (ZA β). Las concentraciones relativas de PDGF-R β y variante Z se muestran en relación con cada grupo de curvas. Se ven analitos que contienen mayores concentraciones de molécula variante Z y tampón HBS-EP cerca de la línea basal.

La Figura 4 es una visión de conjunto de las selecciones realizadas en el Ejemplo 1 (A) y en el Ejemplo 4 (B) que muestran concentraciones de diana (nM) y número de lavados (en paréntesis). La selección de la primera biblioteca, (A), se realizó en cuatro ciclos divididos inicialmente en dos pistas (I y II). En el segundo ciclo de selección, estas se dividieron adicionalmente en dos pistas (Ia y Ib, IIa y IIb), dando como resultado un total de cuatro pistas. Se realizaron selecciones de pista Ia y Ib frente a PDGF-R β no biotinilado y se realizaron selecciones de pista IIa y IIb frente a PDGF-R β biotinilado. Se realizó inicialmente selección de la biblioteca madura, (B), en cuatro pistas. Estas se dividieron adicionalmente en el ciclo dos, dando como resultado un total de seis pistas. La selección se realizó en cuatro ciclos.

Las Figuras 5A-C muestran el resultado de un análisis de unión realizado en un instrumento Biacore. Se ensayaron diferentes variantes Z monoméricas de la biblioteca madura (Ejemplo 4) con respecto a su unión a receptores de PDGF. A) Muestra la unión a PDGF-R β humano, B) muestra la unión a PDGF-R β murino y C) muestra la unión a PDGF-R α humano. Se inyectaron cinco variantes Z diferentes en duplicados o triplicados sobre superficies de microplaca de Biacore con receptores de PDGF inmovilizados; Z02558, Z02516, Z02483, Z02477 y Z02465. Se ejecutaron dos variantes Z de la selección en el Ejemplo 1 como referencias (Z01977 y Z01982), así como una inyección de tampón de ejecución HBS-EP.

Las Figuras 6A-C muestran sensogramas de experimentos cinéticos realizados en un instrumento Biacore con ajuste de curva en un modelo de unión de Langmuir 1:1. Se inyectaron diversas concentraciones de las diferentes variantes Z A) Z01982, B) Z02465 y C) Z02483 en PDGF-R β humano inmovilizado. Las curvas rectas representan el modelo ajustado.

Las Figuras 7A-D muestran imágenes del experimento de inmunofluorescencia descrito en el Ejemplo 5. Las imágenes muestran células AU565 que expresan PDGF-R β teñidas con diferentes anticuerpos o variantes Z: A) anticuerpo de cabra anti- PDGF-R β , B) His $_6$ -(Z02465) $_2$ -Cys, C) His $_6$ -(Z02483) $_2$ -Cys y D) His $_6$ -(Z02516) $_2$ -Cys.

La Figura 8 muestra el resultado del experimento de citometría de flujo descrito en el Ejemplo 5. La Figura muestra titulación de His $_6$ -(Z02465) $_2$ -Cys (◆), His $_6$ -(Z02483) $_2$ -Cys (■) y His $_6$ -(Z02516) $_2$ -Cys (▲) conjugados con Alexa Fluor® 647 en células AU565 que expresan PDGF-R β . La intensidad de fluorescencia media se representó frente a concentración logarítmica (ng/ml) de variantes Z.

Ejemplos

Se usaron los siguientes materiales a lo largo del presente trabajo excepto cuando se indique otra cosa.

- Cepa de *Escherichia coli* RR1ΔM15 (Rüther, Nucleic Acids Res 10: 5765-5772, 1982)
- El domino extracelular de PDGF-Rβ humano recombinante con una fusión de Fc C terminal y marcador His₆ (R&D Systems, N° 385-PR/CF)
- PDGF-Rβ-Fc murino (R&D Systems, N° 1042-PR/CF)
- PDGF-sRα humano (R&D Systems, N° 322-PR/CF)
- PDGF-BB (R&D Systems N° 220-BB/CF)

Ejemplo 1: Selección y exploración de polipéptidos de unión a PDGF-Rβ

Materiales y procedimientos

Biotinilación de proteína diana: El domino extracelular de PDGF-Rβ humano recombinante se biotiniló con un exceso molar 10x de Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ-link (Pierce N° 21327) en PBS (fosfato 10 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,68 mM, pH 7,4). Para retirar cualquier exceso de biotina, se realizó un intercambio de tampón en columnas PD-10 de desalación (GE Healthcare N° 17-0851-01), preequilibradas con PBS de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Preparación de perlas de estreptavidina acopladas con Z00000 y revestidas con Fc:

Se acopló Z00000 biotinilada (Affibody AB, N° 10.0623.02.0005), es decir proteína Z (SEC ID N°: 538) como se describe en Nilsson y col, Prot Eng 1: 107-113, 1987, con perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (Streptavidina Dynabeads[®] M-280, Dynal N° 112.06). Se añadieron 15 μg de (Z00000)₂-Cys-biotina por mg de perlas y las perlas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente (TA). Las perlas se lavaron con PBS-T 0,1 (PBS complementado con Tween 20 0,1 %). Las perlas acopladas a Z00000 se revistieron a continuación con IgG1-Fc humano policlonal (Jackson Immuno Research N° 009-000-008) por incubación de extremo sobre extremo durante 1 hora a TA usando 4 μg de Fc por mg de perlas acopladas a Z00000. Las perlas se lavaron con PBS-T 0,01 antes de su uso en la preselección descrita posteriormente.

Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-Rβ: Se usó una biblioteca de variantes aleatorias de proteína Z presentada en bacteriófagos, construida en fagémido pAffi1/pAY00065 como se describe en Grönwall y col, J Biotechnol 128: 162-183 (2007), para seleccionar polipéptidos de unión a PDGF-Rβ. La selección se realizó en cuatro ciclos divididos inicialmente en dos pistas (I y II). En el segundo ciclo de selección, estas se dividieron adicionalmente en dos pistas, dando como resultado un total de cuatro pistas (Ia=alta concentración de diana, Ib=baja concentración de diana, IIa=alta concentración de diana y IIb=baja concentración de diana). Las pistas Ia y Ib se realizaron frente a PDGF-Rβ no biotinilado y las pistas IIa y IIb frente a PDGF-Rβ biotinilado. Se muestra una visión de conjunto de la estrategia de selección en la Figura 4A.

Se preparó reserva de biblioteca de fagos de acuerdo con procedimientos anteriormente descritos (Nord y col, Nat Biotech 15: 772-777 (1997); Hansson y col, Immunotechnology 4: 237-252 (1999)). Antes de la selección, la reserva de fagos se precipitó dos veces en PEG/NaCl (polietilenglicol (PEG) 20 %, NaCl 2,5 M) y se disolvió en 1 ml de tampón de selección (gelatina 0,1 % en PBS-T 0,1). Para reducir la cantidad de aglutinantes de fondo, se realizó una preselección por incubación de la reserva de fagos con perlas de estreptavidina acopladas a Z00000 biotinilada revestidas con proteína Fc (pista I) o con perlas de estreptavidina (pista II) durante 1 h a TA. Todos los tubos y perlas usados en la selección se prebloquearon con tampón de selección.

En el ciclo 1 de la selección, el sobrenadante resultante de la preselección se mezcló con PDGF-Rβ 100 nM (pista I) o PDGF-Rβ biotinilado 100 nM (pista II), seguido de incubación en rotación continua durante 2 horas a TA. Los complejos de diana-fago se capturaron en perlas de estreptavidina mediante Z00000 biotinilada (0,5 mg de perlas, 20 minutos, pista I) o directamente en perlas de estreptavidina (0,77 mg de perlas, 15 minutos, pista II). Los fagos unidos a perla se lavaron 2 veces con 1000 μl de PBS-T 0,1. Después del lavado, los fagos unidos se eluyeron con 500 μl de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 seguido de neutralización inmediata con 50 μl de Tris-HCl, pH 8,0 y 450 μl de PBS. Las partículas de fago seleccionadas se amplificaron como se describe posteriormente y se prepararon nuevas reservas de fagos entre cada ciclo. La reserva de fagos, es decir fagos que entraban en el ciclo de selección y partículas de fago eluidas se titularon después de cada ciclo de selección.

En el ciclo 2, las pistas de selección I y II se dividieron respectivamente en pistas de selección Ia y Ib y pistas IIa y IIb. Por lo tanto, las nuevas reservas de fago preparadas se incubaron con PDGF-Rβ 50 nM (Ia) o 20 nM (Ib) en tampón de selección en rotación continua durante 2 horas a TA. Se capturaron complejos de diana-partícula de fago como en el ciclo 1 con 0,25 mg (Ia) o 0,1 mg (Ib) de perlas durante 20 (Ia) o 15 (Ib) minutos. De forma similar, se incubaron reservas de fagos con PDGF-Rβ biotinilado 50 nM (IIa) o 20 nM (IIb) en tampón de selección, seguido de captura con 0,4 mg (IIa) o 0,15 mg (IIb) de perlas. El lavado se realizó como en el ciclo 1 pero con 4 lavados. Se realizó elución como en el ciclo 1.

En el ciclo 3, se incubaron reservas de fago con PDGF-R β 25 nM (Ia) o 4 nM (Ib) en rotación continua como se ha descrito anteriormente, seguido de captura con 0,15 mg (Ia) o 0,1 mg (Ib) de perlas. De forma similar, se incubaron reservas de fagos con PDGF-R β biotinilado 25 nM (IIa) o 4 nM (IIb) y se capturaron con 0,2 mg (IIa) o 0,1 mg (IIb) de perlas. El lavado se realizó como en el ciclo 2 pero con 6 lavados. Se realizó elución como en el ciclo 1.

- 5 En el último ciclo de selección, se incubaron reservas de fago con PDGF-R β 12,5 nM (Ia) o 0,8 nM (Ib) en rotación continua y se capturaron con 0,15 mg (Ia) o 0,1 mg (Ib) de perlas. De forma similar, se incubaron reservas de fagos con PDGF-R β biotinilado 12,5 nM (IIa) o 0,8 nM (IIb) en rotación continua y se capturaron con 0,2 mg (IIa) o 0,1 mg (IIb) de perlas. El lavado se realizó como en el ciclo 3 pero con 12 lavados. La elución se realizó como en el ciclo 1.

- 10 Amplificación de partículas de fago: Se infectaron células *E. coli* RR1 Δ M15 de fase logarítmica con 950 μ l de partículas de fago eluidas durante 20 minutos a 37 °C después de cada ciclo de selección. Las fagos que aún estaban unidos a perlas después de la elución se amplificaron de forma similar. Después de 20 minutos de incubación a 37 °C, las células infectadas con fago eluido y las células infectadas con fago unido a perla que se originaban del mismo ciclo y pista de selección, se agruparon y se sedimentaron por centrifugación. El sedimento se disolvió en un volumen pequeño de medio TSB-YE (TSB 30 g/l, extracto de levadura 5 g/l) y se extendieron en
15 placas de extracción de levadura de triptona (TYE: agar 15 g/l, agua con triptona 10 g/l (Merck), extracto de levadura 5 g/l, NaCl 3 g/l, glucosa 2 % y ampicilina 0,1 g/l), seguido de incubación durante una noche a 37 °C. En el ciclo de selección final, las bacterias se diluyeron antes de extenderlas sobre placas TYE para formar colonias sencillas a usar en exploración de ELISA.

- 20 Se resuspendieron bacterias infectadas con fagos crecidas en las placas TYE en medio TSB. Se preparó una cantidad de las células resuspendidas como reserva de glicerol y se almacenaron a -20 °C. Las células suspendidas correspondientes a 100-1000 veces el número de fagos eluidos se inocularon en medio TSB-YE complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 μ g/ml. Las células se cultivaron hasta fase log a 37 °C. Se infectó una cantidad de células correspondiente a la misma cantidad de células usada para inoculación con un exceso 20x de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs N $^{\circ}$ NO315S) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se sedimentaron por
25 centrifugación, se resuspendieron en medio TSB-YE complementado con IPTG 100 μ M (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido 1 M), kanamicina 25 μ g/ml y ampicilina 100 μ g/ml y se cultivó durante una noche a 30 °C. Los cultivos de una noche se centrifugaron y las partículas de fago en el sobrenadante se precipitaron dos veces con tampón PEG/NaCl. Finalmente, los fagos se resuspendieron en tampón de selección antes de entrar en el siguiente ciclo de selección.

- 30 Exploración de ELISA de variantes Z: Para ensayar si las moléculas variantes Z podían de hecho interactuar con el PDGF-R β , se realizó un ELISA. Las variantes Z se produjeron inoculando colonias sencillas, preparadas como se ha descrito anteriormente, en 1 ml de medio TSB-YE complementado con ampicilina 100 μ g/ml e IPTG 0,1 mM en placas de pocillos profundos (Nunc N $^{\circ}$ 278752). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C. Después de
35 la incubación, se realizaron repeticiones de placas transfiriendo una pequeña fracción de cada cultivo a placas de 96 pocillos con glicerol 15 % para almacenamiento a -20 °C. Las células restantes se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en 300 μ l de PBS-T 0,05 (PBS complementado con Tween 20 0,05 %) y se congelaron a -80 °C para liberar la fracción periplásmica de las células. Las muestras congeladas se descongelaron en un baño de agua y las células se sedimentaron por centrifugación. El sobrenadante periplásmico contenía las variantes Z como fusiones con un dominio de unión a albúmina (ABD, GA3 de proteína G de cepa de *Streptococcus* G148), expresado como AQHDEALE-[Z#####]-VDYV-[ABD]-YVPG (Grönwall y col, mencionado anteriormente). Z##### se refiere a
40 variantes Z individuales.

- Se revistió media área de placas de ELISA de 96 pocillos (Costar N $^{\circ}$ 3690) con 50 μ l/pocillo de tampón de revestimiento (carbonato sódico 50 mM, pH 9,6) que contenía albúmina de suero humano 6 μ g/ml (HSA, Sigma N $^{\circ}$ A3782) y se incubó durante una noche. La solución de HSA se retiró por vertido y los pocillos se bloquearon con 100
45 μ l de PBS-T 0,1 complementado con solución de leche en polvo sin grasa 2 % (Semper AB) durante 1 h a TA. La solución de bloqueo se descartó y se añadieron 50 μ l de solución periplásmica a los pocillos y se incubó durante 1,5 horas a TA con agitación lenta. Los sobrenadantes se retiraron por vertido y los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-T 0,05. Se añadieron 50 μ l de una mezcla que contenía PDGF-R β tanto biotinilado como no biotinilado a una concentración de 4,5 μ g/ml en PBS-T 0,1 a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1,5 horas a TA seguido de
50 lavado 4x en PBS-T 0,05. Las placas de control de IgG-Fc se prepararon por adición de Fc 3 μ g/ml de IgG humana en 50 μ l de PBS-T a los pocillos. Las placas de control se incubaron durante 1,5 horas a TA y se lavaron como se ha descrito anteriormente. Se añadió un anticuerpo contra Fc (DAKO, N $^{\circ}$ P0214), marcado con peroxidasa de rábano rusticano y se diluyó 1:4000 en PBS-T 0,1, a los pocillos. Después de lavar como se ha descrito anteriormente, se añadieron 50 μ l de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce N $^{\circ}$ 34021) a los pocillos y las placas se trataron de
55 acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Todas las etapas de bloqueo a lectura se realizaron en un robot Tecan Genesis Freedom 200 (Tecan Group LTD). La absorbancia de los pocillos se leyó a 450 nm en un lector de ELISA Tecan Ultra 384 (Tecan) y se evaluó con software Magellan v. 5.0 (Tecan).

- Secuenciación: A partir de la exploración de ELISA, se seleccionaron los clones considerados positivos para secuenciación. Los fragmentos de PCR se amplificaron de colonias sencillas usando un programa de PCR convencional y los cebadores AFFI-21 (5'-tgcttccggctcg-tatgtgtgtg) y AFFI-22 (5'-cgggaaccagagccaccaccgg). La

secuenciación de fragmentos amplificados se realizó usando el oligonucleótido biotinilado AFFI-72 (5'-biotina-cggaaccagagccaccaccgg) y un kit de secuenciación en ciclo BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems), usado de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las reacciones de secuenciación se purificaron uniendo a perlas revestidas con estreptavidina magnéticas usando un Magnatrix 8000 (Magnetic Biosolution) y se analizaron en Analizador Genético ABI PRISM[®] 3100 (PE Applied Biosystems). Los resultados de secuenciación se importaron y analizaron con un software ALD LIMS Nautilus[™] 2003 R2 B3 (Thermo Electronics Corp.).

Subclonación de variantes Z: Se amplificaron variantes Z monoméricas y dimericas de vectores pAffi1/pAY00065. Se realizó una PCR usando diferentes pares de cebadores y los fragmentos génicos resultantes se purificaron e hibridaron en tampón de ligasa.

Los fragmentos génicos hibridados se subclonaron en el vector pAY01448, proporcionando un marcador His₆ N terminal (His₆-Z#####) y en el vector pAY01449, proporcionando un marcador His₆ N terminal y una cisteína C terminal (His₆-(Z#####)₂-Cys). Las variantes Z de unión a PDGF-R β se subclonaron como monómeros en pAY01448 y como dímeros en pAY01449 y las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron MGSSHHHHHLQ-[Z#####]-VD para los monómeros y MGSSHHHHHLQ-[Z#####][Z#####]-VDC para los dímeros. Para los dímeros, se usó una ligación de tres partes para inserción de ambos fragmentos de inserto en el vector en la misma etapa. Se ligaron fragmentos génicos hibridados y vectores de expresión digeridos con Accl y desfosforilados en tampón de ligasa y se electroporaron en células *E. coli* TOP1 0 electrocompetentes. Las células transformadas se extendieron sobre placas TBAB (base de agar sangre de triptosa 30 g/l) complementadas con kanamicina 50 μ g/ml, seguido de incubación a 37 °C durante una noche. Las colonias se exploraron usando PCR y las longitudes de fragmentos de PCR se verificaron en geles de agarosa. Para verificar las secuencias, se realizó secuenciación con Kit de Secuenciación en Ciclo BigDye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems), seguido de análisis en un Analizador Genético ABI PRISM[®] 3100 (PE Applied Biosystems) y evaluación usando software Sequencher[™] 4.0.5. (Gene Codes Corporation).

Se preparó reserva de AND plasmídico a partir de los clones secuenciados y se depositó en -80 °C. Además, se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) con los plásmidos, a través de electroporación (construcciones monoméricas) o a través de transformación de células químicamente competentes (construcciones dimericas).

Resultados

Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R β : Se realizaron cuatro ciclos de selecciones de presentación de fagos frente a PDGF-R β humano no biotinilado (pista I) y biotinilado (pista II) fusionado con la parte Fc de IgG. Se capturaron complejos de diana-partícula de fago en perlas revestidas de estreptavidina con (I) o sin (II) Z00000-biotina acoplada a perla. Los cuatro ciclos de selección se realizaron con la) diana no biotinilada, alta concentración de diana, lb) diana no biotinilada, baja concentración de diana, IIa) diana biotinilada, alta concentración de diana y IIb) diana biotinilada, baja concentración de diana. Para cada ciclo de selección, el número de lavados se aumentó. Las titulaciones de partículas de fago y los rendimientos se calcularon después de cada ciclo de selección. El rendimiento de partículas de fago (partículas de fago fuera/partículas de fago dentro) aumentó para cada ciclo (excepto el segundo), indicando un enriquecimiento de clones de unión a diana.

Exploración de ELISA de variantes Z: Los clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección se produjeron en placas de 96 pocillos y se exploraron con respecto a actividad de unión a PDGF-R β en un ELISA. En paralelo, se ensayó la unión a Fc para cada clon. En total se exploraron 93 clones de cada pista de selección (Ia, Ib, IIa, IIb). Las mediciones de absorbancia mostraron muchos clones claramente positivos para PDGF-R β y unos pocos clones positivos para Fc. Se usó una molécula variante Z de selecciones frente a CD33 como controles positivos y negativos. El control positivo se detectó con CD33-Fc humano y el control negativo no se detectó. Secuenciación: Se realizó secuenciación para los clones con los valores de mayor absorbancia frente a PDGF-R β y con valores de baja absorbancia frente a Fc, es decir valores iguales a valores de absorbancia de fondo, en la exploración de ELISA. En total, se ejecutaron 147 clones positivos para PDGF-R β . La mayoría de los clones se hallaron en varias copias. Sin embargo, se identificaron once nuevas variantes Z. Se proporcionó a cada variante un número de identificación único ##### y las variantes individuales se denominan Z#####. Las secuencias de aminoácidos de las variantes Z de 58 restos aminoácidos de largo se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 359-369. Los motivos de unión a PDGF-R β deducidos de estas variantes Z se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 1-11. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de 49 restos aminoácidos de largo que se ha predicho que constituyen el conjunto de tres hélices completo dentro de cada una de estas variantes Z se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 180-190.

Las secuencias únicas se agruparon juntas en un grupo de secuencias similares con una disimilitud interna menor de aproximadamente 25 % (resultados no mostrados). La similitud de secuencia sugiere que las variantes Z se unen a la misma superficie de unión en el receptor PDGF-R β .

Subclonación de variantes Z: Los clones únicos se seleccionaron para subclonación en los vectores de expresión pAY01448 y pAY01449 como monómeros y dímeros, respectivamente. La clonación dio como resultado ocho monómeros (Z01977, Z01978, Z01980, Z01981, Z01982, Z01983, Z01983, Z01994 y Z01995) y siete dímeros (dímeros de Z01976, Z01977, Z01980, Z01982, Z01983, Z01994 y Z01995).

Ejemplo 2: Producción y caracterización de variantes Z*Materiales y procedimientos*

Expresión y purificación de proteínas: Se dejaron crecer cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados como se subclonaron en el Ejemplo 1 hasta una densidad óptica de aproximadamente 1 (diluido 10x) y se indujo expresión proteica por adición de IPTG 1 M (0,5 ml/l de cultivo). Los cultivos se recogieron 5 horas después de la inducción, por 20 minutos de centrifugación a 15900 g. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se recogieron y almacenaron a -20 °C antes de su uso adicional.

Las variantes Z de unión a PDGF-R β se purificaron de sedimentos celulares en condiciones desnaturalizantes en columnas Ni-NTA Superflow (Qiagen) y se intercambió el tampón a PBS usando columnas PD-10 (GE Healthcare). Los niveles de expresión de proteínas solubles e insolubles se analizaron usando SDS-PAGE por determinación ocular de geles teñidos con Coomassie. Las variantes Z purificadas que no eran para usarse directamente se separaron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

Caracterización de proteínas: La concentración de las variantes Z purificadas (en forma His₆-Z##### y en forma His₆-(Z#####)₂-Cys) se determinó por mediciones de absorbancia a 280 nm usando coeficientes de extinción teóricos. La pureza se estimó por análisis de SDS-PAGE en geles de NuPAGE™ 4-12 % de 10 pocillos (Invitrogen) usando tinción azul de Coomassie. Para verificar la identidad y para determinar los pesos moleculares de variantes Z purificadas, se realizó un análisis de EM/CL en un sistema Agilent 1100 LC/MSD (Agilent Technologies). Análisis de CD: Las variantes Z purificadas se descongelaron y se diluyeron en PBS a 0,5 mg/ml. Para cada variante Z diluida se obtuvo un espectro de CD a 250-195 nm a 37 °C. Además, se realizó una medición de temperatura variable (VTM) para determinar la temperatura de fusión (Tm). En la VTM, la absorbancia se midió a 221 nm mientras que la temperatura se elevó de 20 a 90 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/minuto. Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro J-810 de Jasco (Jasco Scandinavia AB) usando una célula con una longitud de ruta óptica de 1 mm.

Análisis de unión de Biacore: Las interacciones de ocho variantes Z de unión a PDGF-R β monoméricas marcadas con His₆ con PDGF-R β humano, PDGF-R β -Fc murino y PDGF-sR α humano se analizaron en un instrumento Biacore (GE Healthcare). Los tres receptores se inmovilizaron en diferentes celdas de flujo en la capa de dextrano carboxilado de una superficie de microplaca CM5 (GE Healthcare). La inmovilización se realizó usando química de acoplamiento de aminas de acuerdo con el protocolo del fabricante. Una superficie de celda de flujo en la microplaca se activó y se desactivó para su uso como blanco durante inyecciones de analitos. Los analitos, es decir variantes Z diluidas en tampón de ejecución HBS-EP (GE Healthcare) a una concentración final de 5 μ M se inyectaron en orden aleatorio por duplicado a un caudal de 10 μ l/minuto durante 3 minutos. Después de 3 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con una inyección de HCl 25 mM. Los resultados se analizaron en software BiaEvaluation (GE Healthcare). Las curvas de la superficie de blanco se restaron de las curvas de las superficies de ligando.

Ensayo de epítomos: La interacción del receptor PDGF-R β con su ligando natural PDGF-BB en presencia de tres variantes Z diferentes (Z01977, Z01980 y Z01982 en forma His₆-Z#####) se analizó en un instrumento Biacore (GE Healthcare). Se inmovilizó PDGF-BB humano en la capa de dextrano carboxilado de dos celdas de flujo en una superficie de microplaca CM5 de Biacore. La densidad de ligando fue diferente en las dos celdas de flujo. Se prepararon analitos que contenían PDGF-R β 100 nM mezclado con diversas concentraciones de variantes Z marcadas con His₆ monoméricas por dilución en el tampón de ejecución HBS-EP. Se usó una variante Z específica para una proteína irrelevante (péptido β amiloide, A β) como un control negativo. Los analitos se inyectaron a un caudal de 10 μ l/minuto durante 3 minutos. Después de 3 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con dos inyecciones de HCl 10 mM. Los resultados se analizaron como se ha descrito anteriormente. Análisis de transferencia puntual: Se ensayaron siete variantes Z de unión a PDGF-R β con respecto a especificidad por análisis de transferencia puntual. Las variantes Z se ensayaron frente a macroglobulina alfa 2 (MP biomedical/Cappel, N° 55833), glicoproteína ácida alfa-1 (RDI, N° RD)-SCP-153-1), alfa-1 antiqumiotripsina (RDI, N° RDI-SCP-159-0), alfa-1-antitripsina (RDI, N° RDI-SCP-165-5), complemento C3 (RDI, N° RDI-SCP-150-0), complemento C4 (RDI, N° RDI-SCP-151-0), fibrinógeno (Enzyme research, N° 031015E), haptoglobulina (RDI, N° RDI-SCP-119-1), hemopexina (Agilent), Fc de IgG1 humana, policlonal (Jackson Immuno Research, N° 009-000-008), holotransferrina (Sigma, N° T0665), IgA humana (Bethyl, N° P80-102), IgE humana (Fitzgerald, N° 30 A101), IgG humana (Sigma, N° G4386), IgM humana (Sigma, N° 18260), PDGF-sR α humano (R&D Systems, N° 322-PR/CF), Albúmina de Suero humano (HSA, Sigma, N° A3782), PDGF-R β -Fc murino (R&D Systems, N° 1042-PR/CF), neutravidina (Pierce, N° 31000), estreptavidina (Pierce, N° 21122), transtiretina (Sigma, N° P1742), y PDGF-R β -Fc humano. Se aplicaron puntualmente en membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) 1 μ l de cada proteína a una concentración de 0,1 mg/ml. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en PBS complementado con caseína 0,5 % (solución de bloqueo) a TA. Después de la retirada de la solución, las membranas se incubaron durante 1 hora con 2 μ g/ml de diferentes variantes Z dimericas, con marcadores His₆ N terminales y cisteínas C terminales. Las membranas se lavaron 4 x 5 minutos en PBS-T 0,1. Las variantes Z se detectaron con una IgG de cabra policlonal contra un epítipo común para todas las variantes Z (Affibody AB, N° 20.1000.01.0005). Esta IgG de cabra anti Z, se diluyó a 1 μ g/ml en solución de bloqueo, se añadió a las membranas que se incubaron durante 1 hora a TA. Después de lavar, se añadió un anticuerpo contra IgG de cabra conjugado con HRP (DAKO N° P0449), diluido 1:10000 en solución de bloqueo, a las

membranas, seguido de incubación de las membranas durante 1 hora a TA. Las membranas se lavaron, se aclararon en PBS y se empaparon con Supersignal (Pierce N° 34075). Se fotografiaron emisiones de luz con un Chemilmager 5500 (Alpha Innotech Corp.).

Resultados

- 5 Producción de proteína: Las moléculas variantes Z tanto monoméricas (en forma His₆-Z#####) como diméricas (en forma His₆-(Z#####)₂-CYS) produjeron niveles de expresión aceptables de producto génico soluble. La pureza de los lotes producidos se evaluó por análisis de SDS-PAGE. Se estimó que la pureza era mayor del 95 % para las moléculas monoméricas y que era aproximadamente 90 % para moléculas diméricas.

El análisis de EM/CL verificó el peso molecular correcto para todas las moléculas variantes Z.

- 10 Análisis de CD: En el análisis de CD, las mediciones de espectros se realizaron a 37 °C. A esa temperatura, las estructuras de hélice alfa de las moléculas variantes Z habrían obtenido un estado parcialmente desplegado. Este resultado también se verificó en las mediciones de temperatura variable en las que se determinaron las temperaturas de fusión (T_m) (Tabla 1).

Tabla 1. Temperaturas de fusión para varias variantes Z

Variante Z	T _m (°C)
His ₆ -Z01977	30
His ₆ -Z01978	43
His ₆ -Z01980	35
His ₆ -Z01981	37
His ₆ -Z01982	37
His ₆ -Z01983	37
His ₆ -Z01994	30
His ₆ -Z01995	36
His ₆ -(Z01976) ₂ -Cys	34
His ₆ -(Z01977) ₂ -Cys	35
His ₆ -(Z01980) ₂ -Cys	35
His ₆ -(Z01982) ₂ -Cys	41
His ₆ -(Z01983) ₂ -Cys	38
His ₆ -(Z01994) ₂ -Cys	31
His ₆ -(Z01995) ₂ -Cys	37

- 15 Análisis de unión de Biacore: La unión de ocho variantes Z monoméricas (Z01977, Z01978, Z01980, Z01981, Z01982, Z01983, Z01994 y Z01995) con PDGF-R β humano y murino, así como con PDGF-sR α humano, se ensayó en un instrumento Biacore inyectando las variantes Z sobre superficies que contenían los tres receptores. Los niveles de inmunización de ligando en las superficies fueron: PDGF-R β humano (celda de flujo 2): 2240 UR, PDGF-R β murino (celda de flujo 3): 2010 UR y PDGF-sR α humano (celda de flujo 4): UR 1900. Todas las variantes Z ensayadas mostraron unión como PDGF-R β tanto humano como murino, pero no mostraron unión con PDGF-R α humano. El resultado se presenta en la Figura 2. Z01982 y Z01977 mostraron las curvas de disociación más lentas para PDGF-R β humano. Z01982 también mostró la curva de disociación más lenta para PDGF-R β murino.

- 25 Ensayo de epítipo: Se ensayó la unión de PDGF-R β humano con su ligando natural PDGF-BB en presencia de variantes Z monoméricas. Los niveles de inmunización de ligando en las superficies fueron: celda de flujo 2 (PDGF-BB): 1130 UR y celda de flujo 3 (PDGF-BB): 5090 UR. Las tres variantes Z ensayadas, Z01977, Z01980 y Z01982, bloquearon la unión de PDGF-R β -PDGF-BB parcialmente a una relación molar 1:1 (es decir variante Z 100 nM y PDGF-R β 100 nM). El resultado se presenta en la Figura 3. Cuando se usó un exceso de diez veces de variante Z

5 en comparación con PDGF-R β , el efecto de bloqueo fue casi completo. Para la variante Z de unión a A β usada como el control negativo, no se vio efecto de bloqueo. Análisis de transferencia puntual: Se realizó un ensayo de especificidad añadiendo variantes Z diméricas purificadas a membranas de nitrocelulosa con puntos de 0,1 μ g de diferentes proteínas. Se detectaron variantes Z unidas con anticuerpos conjugados con HRP que reaccionan a quimioluminiscencia. Se analizaron siete agentes de unión Z01976, Z01977, Z01980, Z01982, Z01983, Z01994 y Z01995. Las señales más fuertes se consiguieron para PDGF-R β humano y murino para todas las variantes Z ensayadas (datos no mostrados). Se vieron algunas señales de fondo para todas las variantes Z, particularmente para las inmunoglobulinas.

10 En resumen, se mostró unión a PDGF-R β tanto humano como murino, que son 79 % idénticos a un nivel de aminoácidos, por las variantes Z en los análisis de unión y en transferencia puntual. Cuando se ensayaron frente a proteínas de suero, Fc y PDGF-R α en un instrumento Biacore y en transferencia puntual, se mostró que los agentes de unión eran negativos, es decir su unión era satisfactoria en lo que concierne a especificidad con respecto a PDGF-R β . Se mostró que tres de los agentes de unión (Z01977, Z01980 y Z01982) bloqueaban la unión del receptor PDGF-R β con su ligando natural PDGF-BB en un ensayo de Biacore. El resultado sugiere que los tres agentes de unión comparten un epítipo en el receptor, puesto que mostraban el mismo resultado de bloqueo. Es probable que los agentes de unión no ensayados en el grupo de secuencias muestren el mismo tipo de patrón de unión.

Ejemplo 3: Diseño y construcción de una biblioteca madura de variantes Z de unión a PDGF-R β

20 En este Ejemplo, se construyó una biblioteca madura. La biblioteca se usó para selecciones de polipéptidos de unión a PDGF-R β . Habitualmente se espera que las selecciones de bibliotecas maduras den como resultado agentes de unión con afinidad aumentada (Orlova y col, Cancer Res 66(8): 4339-48 (2006)).

Materiales y procedimientos

25 Diseño de biblioteca: La biblioteca se basó en las secuencias de las variantes Z de unión a PDGF-R β descritas en los Ejemplos 1 y 2. En la nueva biblioteca, 13 posiciones variables en el armazón de moléculas Z tenían preferencia hacia ciertos restos aminoacídicos, de acuerdo con una estrategia basada en las secuencias variantes Z definidas en SEC ID N $^{\circ}$: 1-11. Se obtuvo un oligonucleótido de 129 pb degenerado que codificaba las posibles variantes de Scandinavian Gene Synthesis AB y se indica AFFI-1011. Las frecuencias teóricas (en %) y distribuciones de restos aminoacídicos en la nueva biblioteca para las 13 posiciones Z variables se proporcionan en la Tabla 2:

Posibles aminoácidos		Posiciones de aminoácidos en la molécula variante Z														
	Pos 2	Pos3	Pos 4	Pos 6	Pos7	Pos 10	Pos 11	Pos 17	Pos 18	Pos 20	Pos 21	Pos 25	Pos 28			
Ala (A)	0	0	6,25	100	6,25	25	17	0	6,25	0	0	0	0			
Arg (R)	50	17	9,375	0	9,375	0	8,25	100	9,375	45	0	37,5	17			
Asn (N)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	100	12,5	0			
Asp (D)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	0	0	0			
Cys(C)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0	0			
Gln (Q)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	12,5	0			
Glu (E)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	0	0	0			
Gly (G)	0	16,5	6,25	0	6,25	0	16,5	0	6,25	0	0	0	16,5			
His (H)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	12,5	0			
Ile (I)	0	16,5	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0	16,5			
Leu (L)	50	17	9,375	0	9,375	0	0	0	9,375	0	0	0	17			
Lys (K)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	5	0	12,5	0			
Met (M)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0	0			
Phe (F)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0	0			
Pro (P)	0	0	6,25	0	6,25	0	0	0	6,25	0	0	0	0			
Ser (S)	0	16,5	9,375	0	9,375	0	8,25	0	9,375	0	0	12,5	16,5			
Thr (T)	0	0	6,25	0	6,25	25	17	0	6,25	0	0	0	0			
Trp (W)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	45	0	0	0			
Tyr (Y)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0	0			
Val (V)	0	16,5	6,25	0	6,25	0	0	0	6,25	0	0	0	16,5			
Parada ámbaar (q)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	5	0	0	0			
Parada (.)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Nº de aa	2	6	20	1	20	6	9	1	20	4	1	6	6			

Construcción de bibliotecas: El oligonucleótido degenerado AFFI-1011 (5'-ctcgaggtagacaacaaattcaacaagaackk-vkynnkgcggctnknkgagatcrrmrvsttacctaactaaaccgtnkc aawrgaacgccttcacmrwagtttvtgtagaccaagccaaagc) se amplificó por PCR usando 100 fmol de AFFI-1011, 50 pmol de cebador directo AFFI-47 (5'-ccccccccctcgaggtagacaacaaattcaa) y 50 pmol de cebador inverso AFFI-50 (5'-ccccctgctagcaagtagcgcttggcttgggtcatc). Puede encontrarse una explicación de la nomenclatura de nucleótidos degenerados en por ejemplo Biochemical Nomenclature and Related Documents, Portland Press, 1992. Se realizaron 95 reacciones de PCR usando polimerasa AmpliTaq Gold (Applied Biosystems N° N808-0244) en 10 ciclos, consistiendo cada ciclo en un periodo de desnaturalización de 15 segundos a 96 °C, un periodo de hibridación de 15 segundos a 60 °C y un periodo de extensión de 1 minuto a 72 °. Después de la amplificación, los productos de OCR se agruparon y purificaron usando kit de purificación de PCR QIAquick® (Qiagen). La concentración y calidad de los fragmentos se determinó por medición de la absorbancia y por análisis en un gel de agarosa. El fragmento amplificado se escindió por restricción a una concentración de 14 ng/ml usando 1000 U de las enzimas *XhoI* y *NheI* (New England Biolabs, N° R0146L, N° 0131M). La mezcla de reacción de 1500 µl se incubó a 37 °C durante 3,5 horas. Los fragmentos escindidos se purificaron usando un kit de purificación de PCR QIAquick®. Las concentraciones de los fragmentos se determinaron por mediciones de absorbancia y la calidad de los fragmentos por análisis en gel de agarosa.

El vector fagémido pAY00065 se restringió con las mismas enzimas, se purificó y se ligó con los fragmentos amplificados. Los fragmentos amplificados (1,93 µg) y el vector (12 µg), en una relación molar de 5:1, se ligaron durante 2 horas a TA. Se usó 50 U de ADN ligasa T4 (Fermentas N° EL0012) por µg de ADN en una mezcla de ligación de 6000 µl y se separó en alícuotas en tubos eppendorf con 500 µl en cada uno. La ligasa se inactivó a 65 °C durante 10 minutos y se recuperó ADN por extracción con fenol/cloroformo (Invitrogen) y precipitación con etanol seguido de disolución en agua desionizada estéril.

Las reacciones de ligación (2 µl de aproximadamente 150 ng/µl) se transformaron en células *E. coli* RRIΔM15 electrocompetentes (100 µl). Inmediatamente después de la electroporación, se añadió aproximadamente 1 ml de medio SOC (medio TSB-YE, glucosa 1 %, MgCl₂ 50 µM, MgSO₄ 50 µM, NaCl 50 µM y KCl 12,5 µM). Las células transformadas se incubaron a 37 °C durante 40-50 minutos. Se tomaron muestras para titulación y para determinación del número de transformantes. Las células se dividieron a continuación en 6 fracciones que se inocularon en 1000 ml de medio TSB-YE, complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 µg/ml y se cultivaron durante una noche a 37 °C. Las células se sedimentaron durante 8 minutos a 6000 g, se resuspendieron en una solución de PBS/glicerol (glicerol aproximadamente 20 %). Las diferentes fracciones celulares se separaron en alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

Preparación de reserva de fago: Se inocularon células de la reserva de glicerol que contenían el vector de fagémido en 2 x 1000 ml de medio TSB-YE, complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer a 37 °C. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica (DO) de 0,65, se infectó la misma cantidad de células que se habían inoculado inicialmente usando un exceso molar 10x de fago auxiliar M13K07 (New England Biolabs). Las células se incubaron durante 30 minutos, se centrifugaron a 2000 g durante 10 minutos y se resuspendieron. Posteriormente, las células se cultivaron en 2x 1000 ml de medio TSB-YE, complementado con IPTG 100 µM para inducción de la expresión, kanamicina 25 µg/ml y ampicilina 100 µg/ml y se dejaron crecer durante una noche a 30 °C. El cultivo inducido se recogió por centrifugación a 2500 g durante 10 minutos. Para separar las partículas de fago de las células, el sobrenadante se precipitó en PEG/NaCl. El tampón de precipitación se añadió al sobrenadante en una relación de volumen 1:4 y la mezcla resultante se incubó en hielo durante 1 hora. Los fagos precipitados se sedimentaron por centrifugación a 10500 g a 4 °C durante 30 minutos y se resuspendieron en H₂O estéril. El procedimiento de precipitación se repitió una vez y los fagos se resuspendieron en 1 ml de PBS. La solución de fago resultante se clarificó de las células y los residuos celulares por centrifugación, seguido de filtración a través de un filtro de 0,45 µm. Se añadió glicerol a una concentración final de aproximadamente 40 %. Las reservas de fago se almacenaron a -80 °C.

Secuenciación: Se secuenciaron clones de la biblioteca de reserva de fago de variantes Z para verificar el contenido y evaluar el resultado de la biblioteca construida en relación con el diseño de la biblioteca. Se realizó secuenciación como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se calculó la distribución de aminoácidos.

50 Resultados

Construcción de biblioteca: La nueva biblioteca se diseñó basándose en un conjunto de variantes Z de unión a PDGF-Rβ con propiedades de unión verificadas (Ejemplos 1 y 2). El tamaño teórico de la biblioteca diseñada fue de 7,5 x 10⁹ variantes Z. El tamaño real de la biblioteca, determinado por valoración y después de transformación en células *E. coli* RRIΔM15, fue de 5,3 x 10⁹ transformantes.

55 La calidad de la biblioteca se ensayó por secuenciación de 95 transformantes y comparando sus secuencias reales con el diseño teórico. Se mostró que los contenidos de la biblioteca real en comparación con la biblioteca diseñada eran satisfactorios. Las posiciones bloqueadas en la secuencia de aminoácidos diseñada se reflejaron en la secuencia real por que sólo los aminoácidos esperados aparecían en estas posiciones. De forma similar, las posiciones polarizadas o dopadas en el diseño también se reflejaron en la secuencia real por que la mayoría de los

aminoácidos esperados aparecían en estas posiciones.

Se construyó por lo tanto exitosamente una biblioteca madura de polipéptidos de unión a PDGF-R β .

Ejemplo 4: Selección, exploración y caracterización de variantes Z de una biblioteca madura

Materiales y procedimientos

- 5 La proteína diana, PDGF-R β recombinante humana, se biotiniló como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se acopló Z00000 dimérico biotinilado a perlas de estreptavidina como se ha descrito en el Ejemplo 1.

10 Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R β : Se realizaron selecciones de presentación de fagos contra PDGF-R β esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 1 usando la nueva biblioteca de moléculas variantes Z descrita en el Ejemplo 3. La selección se realizó inicialmente en cuatro pistas. Estas se dividieron adicionalmente en dos ciclos dando como resultado un total de seis pistas. La selección se realizó en cuatro ciclos (véase Figura 4B para una visión de conjunto de las concentraciones diana y el número de lavados. Para reducir el número de agentes de unión de fondo, los fagos se preincubaron con perlas de estreptavidina acopladas a Z00000 revestidas con proteínas de Fc durante 1 hora a TA antes de los ciclos de selección 1-3.

15 A continuación, se añadió PDGF-R β humano no biotinilado (1a, 1b y 2) y biotinilado (3a, 3b y 4) a la solución de fago. La selección tuvo lugar en tubos bloqueados (prebloqueados en tampón de selección) incubados en agitación durante dos horas. Para capturar los complejos de fago-proteína, la solución de selección se incubó con perlas de estreptavidina acopladas a Z00000 prebloqueadas (1a, 1 b y 2) o perlas de estreptavidina (3a, 3b y 4) durante 20 minutos y durante 15 minutos, respectivamente. A continuación, se retiraron las partículas de fago no unidas lavando con PBS-T 0,1. El número de lavados se aumentó para cada ciclo de selección, comenzando con cuatro lavados en el primer ciclo y terminando con hasta 20 lavados en el último ciclo. Se realizó lavado a TA (2 y 4), 37 °C (1b y 3b) y 45 °C (1a y 3a). La longitud del lavado fue menor de 1 minuto en todas las etapas, excepto para la última etapa de lavado en el último ciclo que duró 30 minutos. Los fagos unidos se eluyeron usando una estrategia de pH bajo en la que se añadieron 500 μ l de glicina-HCl 50 mM, pH 2,2, a las perlas de estreptavidina. Después de 10 minutos de incubación a TA, la solución se neutralizó mediante adición de 450 μ l de PBS y 50 μ l de Tris-HCl 1 M, pH 8.

25 Amplificación de partículas de fago: Después de cada ciclo de selección, se usaron aproximadamente 950 μ l de los fagos eluidos de las diferentes pistas de selección para infectar células *E. coli* RR1 Δ M15 en fase logarítmica. Se infectaron de forma similar fagos unidos a perlas. Después de 20 minutos de incubación a 37 °C, las células infectadas con fago eluido y fago unido a perlas de la misma selección se agruparon (ciclos 1-3) o se mantuvieron separados (ciclo 4). Las células infectadas se recogieron por centrifugación. El sedimento se disolvió en un volumen pequeño de TSB-YE y se extendió posteriormente en placas de TYE. Las placas se incubaron a continuación durante una noche a 37 °C. En el ciclo de selección final se diluyeron bacterias antes de extenderlas sobre placas de TYE para formar colonias sencillas a usar en la exploración de ELISA.

35 Las células de las placas de TYE se resuspendieron en medio TSB. Una parte de las células resuspendidas se almacenó en glicerol a -20 °C. Una cantidad de células suspendidas correspondientes a 100-1000 veces el número de fagos eluidos se inoculó en medio TSB-YE, complementado con glucosa 2 % y ampicilina 100 μ g/ml. Las células se cultivaron hasta fase logarítmica a 37 °C. La misma cantidad de células que se inoculó antes se infectó con exceso 10x de fagos auxiliares M13K07 (New England Biolabs) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación y se resuspendieron en medio TSB-YE complementado con kanamicina 25 μ g/ml, ampicilina 100 μ g/ml e IPTG 100 μ M para inducir la producción de moléculas variantes Z. Los cultivos se incubaron durante una noche a 30 °C. Las partículas de fago se recogieron por centrifugación y precipitación como se ha descrito anteriormente.

45 Exploración de ELISA de variantes Z: Se produjeron moléculas variantes Z por inoculación de colonias sencillas, preparadas como se ha descrito anteriormente, en el medio TSB-YE como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se prepararon placas de ELISA de 96 pocillos de media área como se ha descrito en el mismo ejemplo. Después de retirar la solución de bloqueo de los pocillos, se añadieron 50 μ l de la solución periplásmica que contenía moléculas variantes Z a cada pocillo. Las placas se incubaron a TA durante 1,5 horas. Las placas se lavaron cuatro veces con PBS-T 0,05. Se añadió PDGF-R β humano, a una concentración de 4,5 μ g/ml en 50 μ l de PBS-T 0,1 a los pocillos y las placas se incubaron durante 1,5 horas a TA. Después de lavar como se ha descrito anteriormente, se detectó diana unida a las variantes Z por detección del anticuerpo contra Fc conjugado con HRP, diluido 1:4000 en PBS-T 0,1. Esto se siguió de incubación durante 1 hora a TA. A continuación, se realizó desarrollo como se ha descrito anteriormente. Se midió la absorbancia a 450 nm en un espectrofotómetro de ELISA. Todas las etapas de bloqueo a lectura se realizaron manualmente.

55 Secuenciación de agentes de unión potenciales: De la exploración de ELISA, se seleccionaron clones individuales de las diferentes pistas de selección para secuenciación. Los clones con valores de absorbancia de al menos dos veces la absorbancia de fondo a diez veces la absorbancia de fondo se secuenciaron. Se realizó amplificación de fragmentos génicos y análisis de frecuencia de fragmentos génicos como se ha descrito en el Ejemplo 1.

Análisis de unión de Biacore: Para clasificar los clones secuenciados, se analizaron fracciones periplásmicas que contenían variantes Z de unión a PDGF-R β marcadas con ABD, previamente preparadas para ELISA, en un instrumento de Biacore (GE Healthcare). Se inmovilizaron PDGF-R β humana y HSA en una microplaca CM5 de Biacore; PDGF-R β en la celda de flujo 2 y HSA en la celda de flujo 3 y 4. Se activó y desactivó una superficie de celda de flujo en la microplaca (celda de flujo 1) para su uso como un blanco durante las inyecciones de analito. La inmovilización se analizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Las fracciones periplásmicas se clarificaron a 16000 g durante 5 minutos y se inyectaron a TA. Además, se analizaron algunos agentes de unión a 37 °C. El tampón de ejecución fue HBS-EP y los analitos se inyectaron a un caudal de 10 μ l/minuto durante 5 minutos. Después de 5 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con una inyección de SDS 0,05 % y una inyección de HCl 15 mM. Los resultados se analizaron usando software de BiaEvaluation. Se restaron los sensogramas de la superficie de blanco (celda de flujo 1) de los sensogramas de las superficies de ligando.

Subclonación de moléculas variantes Z en vectores de expresión: Basándose en análisis de secuencia y análisis de unión en Biacore, se seleccionaron varios clones para subclonación en el vector de expresión pAY01449 como se ha descrito en el Ejemplo 1. Se amplificaron fragmentos variantes Z monoméricos y diméricos a partir de los vectores pAff1/pAY00065 como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 1.

Se ligaron vector pAY01449 digerido con Accl y fragmentos variantes Z amplificados usando ADN ligasa T4. La mezcla de ligación se electroporó en células *E. coli* TOP-10 electrocompetentes. Los transformantes resultantes se sembraron en placas TBAB, complementadas con kanamicina 50 μ g/ml, seguido de incubación a 37 °C durante una noche. A continuación, las colonias con las diferentes moléculas variantes Z se exploraron usando PCR y las longitudes de los fragmentos de PCR se verificaron en geles de agarosa.

Para verificar las secuencias, se realizó secuenciación con Kit de Secuenciación en Ciclo BigDye[®] Terminator v3.1 usando cebadores biotinilados en reacciones separadas. Los productos de secuenciación se purificaron usando un Magnatrix 8000 con perlas magnéticas revestidas con estreptavidina y se analizaron en un Analizador Genético ABI PRISM[®] 3100. Las secuencias se evaluaron con software Sequencher[™].

Se preparó ADN plasmídico de clones con secuencia confirmada. Las bacterias se cultivaron durante una noche en medio TSB, complementado con kanamicina 50 μ g/ml. Las células se sedimentaron por centrifugación. Se prepararon plásmidos usando Kit de Miniprep QIAprep Spin y se electroporaron en células *E. coli* BL21 (DE3) electrocompetentes. Los nuevos plásmidos se depositaron a -80 °C. Se almacenaron de forma similar alícuotas de los cultivos de TOP-10 y BL21 DE3 en glicerol a -80 °C.

Resultados

Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R β : Se realizó selección en un total de seis pistas paralelas con cuatro ciclos cada una. Las diferentes pistas de selección diferían en concentración de diana y condiciones de lavado como sigue: 1a) diana no biotinilada, concentración alta, lavado a 37/45 °C, 1b) diana biotinilada, concentración baja, lavado a 37 °C, 2) diana no biotinilada, concentración baja, lavado a TA, 3a) diana biotinilada, concentración alta, lavado a 37/45 °C, 3b) diana biotinilada, concentración baja, lavado a 7 °C y 4) diana biotinilada, concentración baja, lavado a TA. Para cada ciclo de selección, la concentración de diana se redujo y las condiciones de lavado fueron más rigurosas. Se introdujo una presión para estabilidad estructural en las selecciones por el lavado a alta temperatura (37 °C y 45 °C) de complejos de fago-diana. Se determinaron las titulaciones de partículas de fago y rendimiento de partículas de fago (% de fago fuera/fago dentro) después de cada ciclo. Para cada ciclo de selección, el rendimiento de partículas de fago fue mayor (no mostrado), lo que indicó un enriquecimiento de los clones de unión a diana.

Exploración de ELISA de variantes Z: Se produjeron clones obtenidos después de cuatro ciclos de selección en placas de 96 pocillos y se exploraron con respecto a actividad de unión a PDGF-R β usando ELISA. En total, se analizaron 2 x 93 clones del grupo de fago eluido y 2 x 93 clones del grupo de fago unido a perlas. Se describieron muchos clones claramente positivos con señales de hasta 2,2 unidades de absorbancia (UA). Los clones de todas las pistas de selección (y de fago tanto eluido como unido a perla) mostraron señales positivas. Los controles negativos (lisados de un clon negativo, básicamente pAffil/pAY00065, sin inserto de variante Z) fueron claramente negativos (absorbancia < 0,2 UA). El control positivo (Z01977 del Ejemplo 1) dio una señal de absorbancia (0,5-1,4 UA) que era menor que la mayoría de los clones positivos.

Secuenciación: Se secuenciaron 192 clones con señales de ELISA positivas (96 clones del grupo "fago eluido" y 96 clones del grupo "fago unido a perla"). Se proporcionó a cada variante Z individual un número de identificación, Z#####, como se ha descrito anteriormente. En total, se identificaron 163 nuevas moléculas variantes Z. Las secuencias de aminoácidos de las variantes Z de 58 restos aminoacídicos de longitud se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 370-532. Los motivos de unión a PDGF-R β de estas variantes Z deducidos se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 12-174. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de 49 restos aminoacídicos de longitud que se ha predicho que constituyen el conjunto de tres hélices completo dentro de cada una de estas variantes Z se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N^o: 191-353. Entre los clones secuenciados, quince secuencias aparecieron dos veces y una secuencia apareció tres veces.

El agrupamiento de las variantes Z de unión a PDGF-R β secuenciadas mostró que las variantes tenían secuencias similares con una disimilitud interna de hasta 2 %, que corresponde a una diferencia en un aminoácido sencillo.

Análisis de unión de Biacore: Debido al gran número de diferentes variantes Z con fuertes señales en ELISA, se realizó una segunda exploración usando análisis de unión de Biacore. Se seleccionaron clones con altas señales de ELISA, aparición frecuente (>1), origen en selecciones con lavados a 37/45 °C y secuencias similares a Z01982 (una variante de secuencia con alta afinidad por PDGF-R β y Z01978 (una variante de secuencia con Tm alta), para análisis de unión. En total se seleccionaron 45 clones. Se incluyeron Z01977 y Z01982 para comparación. Se usó una molécula variante Z de unión a CD22 como control negativo. Los niveles de respuesta adquiridos del experimento a TA frente a HSA se usaron para aproximación de las concentraciones relativas. Aparte de las diferencias de respuesta debido a los diversos niveles de expresión de molécula variante Z, las formas de los sensogramas en el experimento a TA para los clones explorados frente a PDGF-R β fueron similares. Sin embargo, se vieron pequeñas disimilitudes y relacionando los niveles de expresión de molécula variante Z con los sensogramas de la superficie de PDGF-R β , pudieron clasificarse las variantes Z. En el experimento realizado a 37 °C, pudieron verse pequeñas diferencias entre las variantes Z relacionando las respuestas frente a PDGF-R β con las respuestas frente a HSA. Por lo tanto, se seleccionaron cinco variantes Z (Z02465, Z02477, Z02483, Z02516 y Z02558) para subclonación y análisis adicional, basándose en su baja respuesta a HSA y alta respuesta a PDGF-R β , su curva de disociación lenta, su aparición por duplicado en la selección y/o su fuerte unión a 37 °C.

Subclonación de moléculas variantes Z en vectores de expresión: Se subclonaron con éxito cinco clones, Z02465, Z02477, Z02483, Z05.16 y Z02558, en el vector de expresión pAY01449 como monómeros y dímeros como se ha descrito previamente en este ejemplo.

Ejemplo 5: Producción y caracterización de un subconjunto de variantes Z de unión a PDGF-R β

Materiales y procedimientos

Expresión y purificación de proteínas: Se dejaron crecer cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados de la subclonación descrita en el Ejemplo 4 a 37 °C hasta una densidad óptica de aproximadamente 1 (diluidos 10x) y se indujo expresión proteica por adición de IPTG 1 M (cultivo de 0,5 ml/l). Se recogieron cultivos por centrifugación (20 minutos, 15900 g) 5 horas después de la inducción. Los sobrenadantes se descartaron y los sedimentos celulares se recogieron y almacenaron a -20 °C. Se analizaron los niveles de expresión de proteínas solubles e insolubles usando SDS-PAGE por determinación ocular de geles teñidos con Coomassie.

Se purificaron los monómeros y dímeros constituyentes de las variantes Z de unión a PDGF-R β de Z02465, Z02477, Z02483, Z0516 y Z02558 (en forma de His₆-Z#####-Cys y en forma de His₆-(Z#####)₂-Cys; es decir expresados como las construcciones MGSSHHHHHH-LQ-[Z#####]-VDC y MGSSHHHHHHLQ-[Z#####][Z#####]-VDC, respectivamente) de sedimentos celulares en condiciones desnaturalizantes en columnas de Ni-NTA Superflow (Qiagen), se intercambió el tampón a PBS usando columnas PD-10 (GE Healthcare), se separaron alícuotas y se almacenaron a -80 °C.

Se realizó caracterización de proteínas esencialmente como en el Ejemplo 2. Análisis de CD: Las variantes Z monoméricas purificadas se descongelaron y se diluyeron a 0,5 mg/ml en PBS. Para cada variante Z diluida se obtuvo un espectro de CD a 250-195 nm a 20 °C, seguido de una medición de temperatura variable (VTM) para determinar la temperatura de fusión (Tm). Después de incubación a 20 °C, se obtuvo un segundo espectro de CD 250-195 nm a 20 °C para verificar que la molécula variante Z conservaba su estructura alfa helicoidal después de la VTM. En la VTM, la absorbancia se midió a 221 nm mientras que la temperatura se elevó de 20 a 90 °C, con una pendiente de temperatura de 5 °C/minuto. Las mediciones de CD se realizaron en un espectropolarímetro J-810 Jasco usando una celda con una longitud del camino óptico de 1 mm.

Análisis cinético y de unión de Biacore: Se sometió a cinco moléculas variantes Z monoméricas, con cisteínas bloqueadas por NEM (N-etilmaleimida, Pierce N° 23030) y con marcadores His₆ (His₆-Z#####-Cys-NEM), a estudios de interacción en un instrumento Biacore (GE Healthcare) con PDGF-R β humano, PDGF-R β murino y PDGF-R α humano. Los tres receptores de PDGF se habían inmovilizado previamente (Ejemplo 2) en diferentes celdas de flujo de una microplaca CM5. Los analitos se diluyeron en el tampón de ejecución HBS-EP a una concentración final de 100 nM, se inyectaron por duplicado o triplicado a un caudal de 20 μ l/minuto durante 3 minutos. Después de 3 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con una inyección de HCl 10 mM.

Las afinidades de unión de variantes Z Z02465 y Z02483 (en forma His₆-Z#####-Cys-NEM) y el agente de unión de primera generación Z01982 (en forma His₆-Z#####) para PDGF-R β humano y murino se determinaron en Biacore. Se inmovilizó PDGF-R β humano y murino en diferentes celdas de flujo de una microplaca CM5 de Biacore como se ha descrito anteriormente. Se inyectaron diferentes concentraciones de las variantes Z (100 nM, 40 nM, 16 nM, 6,4 nM y 2,56 nM) en tampón HBS-EP a un caudal de 50 μ l/minuto durante 1 minuto. Después de 1 minuto de disociación, se regeneraron las superficies con una inyección de SDS 0,05 % y una inyección de HCl 10 mM.

Una superficie de celda de flujo de la microplaca se activó y desactivó para su uso como blanco durante inyecciones de analito. Se restaron los sensogramas de la superficie de blanco de los sensogramas de las superficies de ligando.

Se usó software BiaEvaluation (GE Healthcare) para analizar los resultados y calcular las constantes de disociación (K_D).

Análisis de transferencia puntual: Se ensayaron tres variantes Z de unión a PDGF-R β con respecto a especificidad por análisis de transferencia puntual realizado como se describe en el Ejemplo 2 usando moléculas variantes Z diméricas con marcadores His₆ N terminales y cisteínas C terminales.

5 **Citometría de flujo:** Se añadieron cinco moléculas variantes Z diméricas diferentes (20 ó 5 $\mu\text{g/ml}$ en PBS) a $0,5 \times 10^6$ células AU565 que expresan PDGF-R β (células de carcinoma de glándula mamaria humana, ATCC) en un tubo Falcón de 5 ml. Las mezclas se incubaron durante 1 hora en hielo. Posteriormente, las células se lavaron en PBS y se sedimentaron en una centrífuga a 200 g durante 3 minutos. Las moléculas variantes Z unidas se detectaron por adición de anticuerpo de cabra contra variantes Z, seguido de Ig anti cabra conjugado con Alexa Fluor[®] 647 (Invitrogen N° A20347, 5 $\mu\text{g/ml}$). Después de cada adición las células se incubaron durante 45-60 minutos y se lavaron a continuación dos veces en PBS. Como un control, las células AU565 se tiñeron con un anticuerpo de cabra anti- PDGF-R β disponible en el mercado (R&D systems) seguido de un anticuerpo anti-Ig de cabra conjugado con Alexa Fluor[®] 647 (Invitrogen). Después de la tinción, las células se lavaron, se resuspendieron y se analizaron usando un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences). En un segundo conjunto de análisis de citometría de flujo, se usaron His₆-(Z02465)₂-Cys, His₆-(Z02483)₂-Cys y His₆-(Z02516)₂-Cys conjugados con Alexa Fluor[®] 647 para tinción. Las variantes Z se conjugaron usando reactivo de maleimida C2 de Alexa Fluor[®] 647 (Invitrogen). Las células AU565, $0,5 \times 10^6$ por tubo (tubo Falcon de 5 ml), se mezclaron con una serie de diluciones 3 veces de los tres agentes de unión conjugados. Después de una hora de incubación en hielo, las células se lavaron como se ha descrito anteriormente y se resuspendieron en PBS para análisis de Citometría de Flujo usando FACSCanto II.

10 **Inmunofluorescencia:** Se dejaron crecer durante una noche células AU565 en portaobjetos multipocillo (Histolab) para producir una monocapa de células. Al día siguiente, las células se aclararon con PBS y se sometieron a tinción. Las células se tiñeron con una cualquiera de tres moléculas variantes Z (10 $\mu\text{g/ml}$) o un anticuerpo de cabra anti-PDGF-R β (5 $\mu\text{g/ml}$), diluido en PBS en células no fijadas. Después de una hora de incubación, las células se lavaron. Las moléculas variantes Z se detectaron con una Ig de cabra anti-Z purificada (5 $\mu\text{g/ml}$), seguido de Alexa488 anti-IgG de cabra (5 $\mu\text{g/ml}$, Invitrogen N° A21467). El anticuerpo anti- PDGF-R β de cabra se detectó por Alexa488 anti-IgG de cabra. Después de cada adición de anticuerpo, los pocillos se incubaron durante 1 hora y se lavaron con PBS. Las células se fijaron durante 10 minutos con formaldehído 3 % en PBS, seguido de lavado con PBS. Los pocillos se secaron y los portaobjetos de vidrio se montaron con solución antidecoloración (medio de montaje Vectashield para fluorescencia con DAPI, Vector Laboratories N° H-1200) y se analizaron usando un microscopio Leica DM-LA (Leica Microsystems) equipado con una cámara de video de toma de imágenes en vivo.

Resultados

15 **Expresión y purificación de proteínas:** Todas las variantes expresadas, Z02465, Z02477, Z02483, Z02516 y Z02558 (en forma His₆-Z#####-Cys y en forma His₆-(Z#####)₂-Cys) proporcionaron buenos rendimientos de producto génico soluble. La cantidad de moléculas variantes Z purificadas por IMAC varió de 5,5 mg a 12,1 mg por lote purificado y la solubilidad *in vitro* para todas las variantes fue buena. Se estimó en SDS-PAGE que la pureza excedía 90 % para todas las variantes. Los pesos moleculares correctos se verificaron con EM-CL.

20 **Análisis de CD:** Se realizaron mediciones de espectro de CD a 20 °C. A esa temperatura, las estructuras alfa helicoidales de las variantes Z se desarrollaron casi completamente. Una capa de los espectros obtenidos después de las mediciones de temperatura variable (calentamiento a 90 °C seguido de enfriamiento a 20 °C) sobre los espectros obtenidos antes de la medición de temperatura variable mostró que todas las variantes Z se plegaban de nuevo en sus estructuras alfa helicoidales después de calentar a 90 °C (resultado no mostrado). Las temperaturas de fusión se determinaron a partir de las mediciones de temperatura variable y se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Temperaturas de fusión de variantes Z.

Molécula variante Z	Tm (°C)
His ₆ -Z02465-Cys	46
His ₆ -Z02477-Cys	46
His ₆ -Z02483-Cys	44
His ₆ -Z02516-Cys	42
His ₆ -Z02558-Cys	39
His ₆ -(Z02477) ₂ -Cys	46

Análisis cinético y de unión de Biacore: La unión de cinco moléculas variantes Z (en forma His₆-Z##### Cys-NEM) con PDGF-R β humano y murino así como con PDGF-R α humano se ensayó en Biacore inyectando cada una de las moléculas variantes Z monoméricas Z02465, Z02477, Z02483, Z02516 y Z02558 sobre superficies que contenían los tres receptores. Se realizaron comprobaciones con dos variantes de la primera selección (Ejemplo 1). Z01977 y Z01982 (en forma His₆-Z#####). Todas las variantes Z ensayadas mostraron unión a PDGF-R β tanto humano como murino pero no mostraron unión a PDGF-R α humano. Z02465 y Z02483 mostraron las curvas de mayor respuesta frente al receptor tanto humano como murino. Los resultados se presentan en la Figura 5.

Las afinidades de unión de dos variantes Z maduras (Z02465 y Z02483) y una variante Z de la primera selección (Z01982; Ejemplo 1), se determinaron por cálculo de la constante de disociación K_D. El cálculo se basó en los resultados de un experimento de Biacore en el que las moléculas variantes Z, en cinco concentraciones diferentes, se aplicaron sobre una microplaca de Biacore que contenía PDGF-R β humano y murino. Las clasificaciones de inmovilización de ligando en las superficies fueron: celda de flujo 2 (h PDGF-R β): 1110 UR, celda de flujo 3 (h PDGF-R β): UR 3010 y celda de flujo 4 (mPDGF-R β): 3080 UR.

Los cálculos de K_D se realizaron usando un modelo de unión de Langmuir 1:1 en sensogramas de la serie de concentración frente al receptor humano (celda de flujo 2) y el murino (celda de flujo 4). Se consiguió buen ajuste de curva para Z01982 (las cinco concentraciones) así como para Z02465 y Z02483 (todas excepto una concentración) frente a PDGF-R β humano (Figura 6). Para receptor murino, se usaron todas las concentraciones de variante Z en los cálculos (sensogramas no mostrados). Las constantes de disociación calculadas se muestran en la Tabla 4 a continuación.

Tabla 4. Constantes de disociación (K_D) para variantes Z de unión a PDGF-R β

Variante Z	PDGF-R β humano	PDGF-R β murino
His ₆ -Z01982	4 nM	27 nM
His ₆ -Z02465-Cys-NEM	500 pM	7 nM
His ₆ -Z02483-Cys-NEM	400 pM	6 nM

Análisis de transferencia puntual: Las especificidades de Z02516, Z02483 y Z02465 (en forma His₆-(Z#####)₂-Cys) para PDGF-R β se ensayaron usando análisis de transferencia puntual. Se transfirieron 22 proteínas diferentes a membranas de nitrocelulosa. Las 22 proteínas incluyeron 16 proteínas de suero humanas altamente abundantes, PDGF-R β y PDGF-R β humano y de ratón recombinante. Las tres moléculas variantes Z se unieron a PDGF-R β humano y de ratón pero no a PDGF-R α o a ninguna de las otras 19 moléculas. Por lo tanto, la especificidad de las variantes Z ensayadas fue satisfactoria (datos no mostrados).

Citometría de flujo: La capacidad de unión a células de las moléculas variantes Z de unión a PDGF-R β se analizó usando citometría de flujo. Se tiñeron células AU565 que expresaban PDGF-R β con 20 μ g/ml de Z02465, Z02483, Z02477, Z02516 o Z02558 (en forma de His₆-(Z#####)₂-Cys). Las moléculas variantes Z se detectaron con un anticuerpo de cabra anti-Z e IgG anti cabra conjugado con Alexa Fluor[®] 647. Se usó un anticuerpo de cabra anti-PDGF-R β como un control. Las cinco moléculas variantes Z proporcionaron desplazamientos de la intensidad de fluorescencia (datos no mostrados).

Además, las tres moléculas variantes Z Z02465, Z02483 y Z02516 (en forma de His₆-(Z#####)₂-Cys) se conjugaron con Alexa Fluor[®] 647 en la cisteína C terminal y se compararon sus capacidades para unirse a células AU565. Las células se incubaron con las moléculas en una serie de titulaciones de tres veces, variando entre 20000 y 1 ng/ml. Las tres moléculas variantes Z mostraron una unión equivalente a células AU565. El resultado se presenta en la Figura 8.

Inmunofluorescencia: Se detectó PDGF-R β , expresada en las membranas de células AU565, por tinción de inmunofluorescencia usando una cualquiera de las variantes Z diméricas Z02465, Z02483 y Z02516 (en forma de His₆-(Z#####)₂-Cys) o un anticuerpo de cabra anti-PDGF-R β . Se observó tinción de membrana con el anticuerpo de control así como con las tres variantes Z (Figura 7). La tinción con Z02483 dio como resultado un patrón de tinción punteado además de tinción membranosa que podía deberse a PDGF-R β internalizada.

En conclusión, se mostró unión a PDGF-R β tanto humano como murino por las seis variantes Z investigadas en un instrumento Biacore y en análisis de transferencia puntual. Cuando se ensayaron frente a PDGF-R α , Fc y proteínas del suero (Biacore y transferencia puntual), se mostró que las variantes Z eran negativas, es decir las variantes Z mostraron especificidad por PDGF-R β . En experimentos de citometría de flujo, cinco variantes Z diméricas mostraron unión a células que expresaban PDGF-R β . El análisis microscópico mostró que las tres variantes Z más fuertes se unían a la membrana de células, de forma similar al anticuerpo de control específico de PDGF-R β . La variante Z02483 también se unió a otras estructuras, que probablemente eran vesículas internas. Esto sugiere que PDGF-R β reside dentro de la célula. Las temperaturas de fusión para las variantes Z maduras se mejoraron en

comparación con las variantes Z de la primera selección de biblioteca. Las variantes Z02465 y Z02477 alcanzaron una T_m de 46 °C.

Ejemplo 6: Análisis de caracterización y unión de variantes Z mutadas

5 Se sometieron dos variantes Z de la selección descrita en el Ejemplo 4 a mutagénesis dirigida para crear nuevos polipéptidos de unión a PDGF-R β .

Materiales y procedimientos

10 Los motivos de unión a PDGF-R β de variantes Z Z02465 (SEC ID N°: 60) y Z02483 (SEC ID N°: 78) se mutaron para crear las nuevas variantes Z Z03358 (de Z02465, *PBM* enumerada como SEC ID N°: 179 y las secuencias de polipéptidos de 49 y 58 restos aminoacídicos de longitud enumeradas como SEC ID N°: 358 y SEC ID N°: 537, respectivamente), Z02831, Z02832, Z02833 y Z02834 (los cuatro *PBM* de Z02483; enumerados como SEC ID N°: 175-178 y las secuencias de los polipéptidos de 49 y 58 restos aminoacídicos de longitud enumerados como SEC ID N°: 354-357 y SEC ID N°: 533-536, respectivamente).

15 Se introdujeron nuevos aminoácidos en posiciones relevantes del armazón parental en diferentes vectores de expresión. Las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron MGSSLQ-[Z#####]-VDC (Z02465), M-[Z#####]-C (Z03358) y MGSSHHHHHLQ-[Z#####]-VD (Z02831, Z02832, Z02833 y Z02834), retirándose cada M por la célula huésped durante la producción. Las variantes Z se generaron usando oligonucleótidos con diversos codones y una técnica de mutagénesis basada en PCR. Los fragmentos de PCR obtenidos se ligaron a un vector de expresión escindido por enzima de restricción, como se describe en el Ejemplo 1 o usando tecnología In-Fusion (Clontech, N° 639607) y se transformaron en células *E. coli* TOP 10. Se exploraron colonias por PCR y las secuencias se verificaron esencialmente como se describe en el Ejemplo 1. Se prepararon plásmidos y se transformaron en *E. coli* BL21 (DE3).

25 Se expresaron proteínas marcadas con His₆, se liberaron por sonicación y se purificaron esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se expresaron proteínas y marcador His₆ y después se purificaron como sigue: se suspendieron células *E. coli* que portaban Z02465-Cys o Z03358-Cys soluble en Tris-HCl 20 mM, pH 7,1. Para romper las células y liberar el contenido intracelular, las suspensiones celulares se calentaron a 85 °C durante 3 minutos. Los lisados se clarificaron por centrifugación seguida de filtración y se cargaron en 25 ml de Q Sepharose FF (GE Healthcare) empaquetado en una columna XK26 (GE Healthcare), equilibrado previamente con Tris-HCl 20 mM, pH 7,1. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna (CV) de Tris-HCl 20 mM, pH 7,1, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en Tris-HCl 20 mM, pH 7,1, durante 10 CV. El caudal fue de 5 ml/min y se controló la señal de 280 nm. Las fracciones que contenían Z02465-Cys o Z03358-Cys se identificaron por análisis de SDS-PAGE. Las fracciones relevantes se agruparon y se ajustó el pH a 8,0 por adición de Tris-HCl 1 M, pH 8,0, a una concentración final de 50 mM.

35 La cisteína C terminal de las construcciones se redujo por adición de DTT a 20 mM, seguido de incubación a 40 °C durante 3 minutos. Después de la reducción, se añadió acetonitrilo (ACN) a una concentración final de 5 % y se cargó Z02465-Cys o Z03358-Cys reducida en 1 ml de columnas Resource 15 RPC (GE Healthcare), previamente equilibradas con tampón A de RPC (TFA 0,1 %, ACN 5 %, agua 95 %). Después de lavar la columna con 10 CV de tampón A de RPC, las proteínas unidas se eluyeron con un gradiente lineal de 0-40 % de tampón B de RPC (TFA 0,1 %, ACN 80 %, agua 20 %). El caudal fue de 1 ml/min y se controló la señal de 280 nm. Se identificaron las fracciones que contenían Z02465-Cys o Z03358-Cys pura por análisis de SDS-PAGE. Se agruparon fracciones relevantes y el tampón se cambió a NH₄HCO₃ 10 mM, pH 8,0, usando columnas PD10 (GE Healthcare). Las nuevas variantes Z se analizaron por EM-CL para verificación de los pesos moleculares.

40 Las variantes Z purificadas se diluyeron a 0,2 ó 0,5 mg/ml en PBS y se realizaron análisis de CD entre 250 y 195 nm a 20 °C. Posteriormente, se realizaron VTM a 220 nm entre 20 y 90 °C. Se obtuvo otro espectro de CD para las variantes Z después de la VTM.

45 Se ensayó la unión de variantes Z Z02831, Z02832, Z02833, Z02834 y Z02483 (molécula parental; proteína producida en el Ejemplo 4 y NEM tratada como se ha descrito en el Ejemplo 5) con receptores de PDGF (humanos y murinos) en un instrumento de Biacore. Los receptores se inmovilizaron en diferentes celdas de flujo en microplacas de Biacore como se ha descrito en el Ejemplo 2 y las variantes Z, diluidas en tampón HBS-EP, se inyectaron sobre la superficie de microplaca en diferentes concentraciones. Los resultados se analizaron como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se realizó análisis cinético de las variantes Z Z02465 y Z03358 (tratadas con NEM como se ha descrito en el Ejemplo 5) esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 5, usando las concentraciones de variante Z 4 nM, 20 nM y 100 nM y el caudal 30 μ l/min.

Resultados

55 Todas las variantes se expresaron de forma exitosa y mostraron pureza satisfactoria. Se verificaron sus pesos moleculares teóricos por EM-CL. Las temperaturas de fusión (T_m), una estimación de la estabilidad molecular, se determinaron con análisis de CD: Z02831 T_m = 44 °C, Z02832 T_m = 42 °C, Z02833 T_m = 49 °C, Z02834 T_m = 49 °C y Z03358 T_m = 42 °C. Las variantes Z recuperaron su estructura helicoidal después de la VTM, es decir la fusión

era reversible.

5 Una de las variantes Z mutadas, Z02834, mostró una tasa de disociación más rápida de PDGF-R β humano que su molécula parental Z02483. Los otros mutantes de Z02483 (Z02831, Z02832 y Z02833) mostraron unión similar con PDGF-R β humano que Z02483. Todas las variantes Z mutadas mostraron mejor unión con PDGF-R β humano que con PDGF-R β murino. Las constantes de disociación (K_D) se calcularon como se ha descrito en el Ejemplo 5 usando sensogramas de las inyecciones de 4 nM y 20 nM. Los valores de K_D calculados se muestran en la Tabla 5 a continuación.

Tabla 5. Constantes de disociación (K_D) para variantes Z de unión a PDGF-R β

Variante Z	PDGF-Rβ humano	PDGF-Rβ murino
Z02465-Cys-NEM	640 pM	7 nM
Z03358-Cys-NEM	440 pM	7 nM

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de unión a receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-R β), que comprende un motivo de unión a receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas beta, *PBM*, consistiendo dicho motivo en la secuencia de aminoácidos seleccionada de

5 i) EX₂X₃X₄AAX₇EID X₁₁LPNLX₁₆X₁₇X₁₈QW NAFIX₂₅X₂₆LX₂₈X₂₉,

en la que, de forma independiente entre sí,

X₂ se selecciona de L, R y I;

X₃ se selecciona de R, I, L, V, K, Q, S, H, y A;

X₄ se selecciona de A, R, N, D, Q, E, H, K, M, S, T, W, F y V;

X₇ se selecciona de A, R, D, Q, E, G, K y S;

10 X₁₁ se selecciona de A, R, N, D, E, G, K, S, T y Q;

X₁₆ se selecciona de N y T;

X₁₇ se selecciona de R y K;

X₁₈ se selecciona de A, R, N, D, C, Q, E, G, L, K, M, S, T, W y V;

X₂₅ se selecciona de K, R, Q, H, S, G y A;

15 X₂₆ se selecciona de S y K;

X₂₈ se selecciona de V, R, I, L y A;

X₂₉ se selecciona de D y K;

y

20 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 90 % de identidad con la secuencia definida en i), y en la que el polipéptido de unión a PDGF-R β se une a PDGF-R β de modo que el valor de K_D de la interacción es como máximo 1 x 10⁻⁶ M.

2. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la reivindicación 1, en el que i) es una secuencia seleccionada de SEC ID N^o: 1-179.

3. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la reivindicación 2, en el que i) se selecciona de SEC ID N^o: 2-3, SEC ID N^o: 5, SEC ID N^o: 7, SEC ID N^o: 11-12, SEC ID N^o: 18-19, SEC ID N^o: 38, SEC ID N^o: 42, SEC ID N^o: 44, SEC ID N^o: 47, SEC ID N^o: 60-62, SEC ID N^o: 64, SEC ID N^o: 67-68, SEC ID N^o: 71-72, SEC ID N^o: 78, SEC ID N^o: 80-81, SEC ID N^o: 83, SEC ID N^o: 86, SEC ID N^o: 91-92, SEC ID N^o: 94-97, SEC ID N^o: 101-103, SEC ID N^o: 105, SEC ID N^o: 109, SEC ID N^o: 111, SEC ID N^o: 116, SEC ID N^o: 119, SEC ID N^o: 133, SEC ID N^o: 137, SEC ID N^o: 139-140, SEC ID N^o: 149, SEC ID N^o: 153, SEC ID N^o: 160, SEC ID N^o: 164, SEC ID N^o: 170, SEC ID N^o: 174 y SEC ID N^o: 179.

4. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que dicho motivo de unión a PDGF-R β forma parte de un dominio proteico de conjunto de tres hélices.

5. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

35 i) K-[*PBM*]-DPSQSX_aX_bLLX_cEAKKLNDX_dQ;

en la que

[*PBM*] es un motivo de unión a PDGF-R β como se ha definido en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3;

X_a se selecciona de A y S;

X_b se selecciona de N y E;

40 X_c se selecciona de A y S;

X_d se selecciona de A y S;

y

45 ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 80 % de identidad con una cualquiera de las secuencias definidas anteriormente.

6. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la reivindicación 5, en el que i) se selecciona de SEC ID N^o: 180-358.

7. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la reivindicación 6, en el que i) se selecciona de SEC ID N^o: 181-182, SEC ID N^o: 184, SEC ID N^o: 186, SEC ID N^o: 190, SEC ID N^o: 239, SEC ID N^o: 251, SEC ID N^o: 257, SEC ID N^o: 290, SEC ID N^o: 332 y SEC ID N^o: 358.

8. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N^o: 359-537.

9. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N^o: 360-361, SEC ID N^o: 363, SEC ID N^o: 365, SEC ID N^o: 369, SEC ID N^o: 418, SEC ID N^o: 430, SEC ID N^o: 436, SEC ID N^o: 469, SEC ID N^o: 511 y SEC ID N^o: 537.

10. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
11. Polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 para su uso como un medicamento.
- 5 12. Combinación de un polipéptido de unión a PDGF-R β de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y un agente terapéutico.
13. Combinación de acuerdo con la reivindicación 12 para su uso como un medicamento.
- 10 14. Polipéptido de unión a PDGF-R β o combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12, para tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R β seleccionada de enfermedad cancerosa, tal como gliomas, sarcomas y leucemias; trastornos vasculares, tales como aterosclerosis, reestenosis, hipertensión pulmonar y enfermedades retinales; enfermedades fibróticas, tales como fibrosis pulmonar, cirrosis hepática, esclerodermia, glomeruloesclerosis y fibrosis cardiaca.

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
PBM01976	ERAEAAQEIDQLPNLNRGQWNAFIASLVD	SEC ID N°: 1
PBM01977	ERQVAAAEIDALPNLNRGQWNAFIASLVD	SEC ID N°: 2
PBM01978	ELSDAAQEIDSLPNLNRSQWNAFIKSLID	SEC ID N°: 3
PBM01979	ERREAAAEIDNLPNLNRSQWNAFIQSLVD	SEC ID N°: 4
PBM01980	ERREAAKEIDSLPNLNRRTQWNAFIRSLAD	SEC ID N°: 5
PBM01981	ELRHAASEIDDLPNLNRQAQWNAFIRSLRD	SEC ID N°: 6
PBM01982	ELVRAAQEIDEL PNLN RGQWNAFIKSLV D	SEC ID N°: 7
PBM01983	EIKGAAAREIDALPNLNKKQWNAFIQSLAD	SEC ID N°: 8
PBM01993	ERHRAAQEIDQLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 9
PBM01994	EIKFAAGEIDNLPNLNRKQWNAFIGSLRD	SEC ID N°: 10
PBM01995	ERLKAAAEIDALPNLNRKQWNAFISSLRD	SEC ID N°: 11
PBM02417	ELRAAAAEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 12
PBM02418	ERLEAAEEIDSLPNLNRQAQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 13
PBM02419	ELIKAAAEIDALPNLNRQRWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 14
PBM02420	ERIHAAAREIDALPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 15
PBM02421	ELIKAAAEIDGLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 16
PBM02422	ELVEAAAREIDSLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 17
PBM02423	ELIKAAREIDELPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 18
PBM02424	ELLAAAAEIDSLPNLNRQAQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 19
PBM02425	ELINAAKEIDDLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 20
PBM02426	ELVEAAAREIDALPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 21
PBM02427	ELRDAAAAEIDRLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 22
PBM02426	ELSAAAAREIDNLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 23
PBM02429	ELISAEEEIDDLPNLNRQRWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 24
PBM02430	ELVDAAREIDELPNLNRVQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 25
PBM02431	ELIEAAAREIDALPNLNRSQWNAFIKSLRD	SEC ID N°: 26
PBM02432	ELVEAAAKEIDKL PNLN RRQWNAFIKSLV D	SEC ID N°: 27
PBM02433	ELRQAAAKEIDNLPNLNRQAQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 28
PBM02434	ELVAAAREIDSLPNLNRRTQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 29

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PBM02435	ELRNAAKEIDSLPNLRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 30
PBM02436	ELVQAAREIDELPNLNRQTQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 31
PBM02437	ELREAAEEIDNLPNLRVQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 32
PBM02438	ELIEAAAREIDNLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 33
PBM02439	ELINAAREIDGLPNLRMQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 34
PBM02440	ERIAAAQEIDGLPNLRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 35
PBM02441	ELINAAKEIDDLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 36
PBM02442	ERSHAAQEIDALPNLNRVQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 37
PBM02443	ELIAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 38
PBM02444	ERIRAAEEIDGLPNLNRWQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 39
PBM02445	ELVQAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 40
PBM02446	ERREAAAREIDNLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 41
PBM02447	ELRWAAGEIDKL PNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 42
PBM02448	ELSRAAEEIDRLPNLNRVQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 43
PBM02449	ELIEAAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 44
PBM02450	ELIAAAKEIDDLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 45
PBM02451	ERVRAAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 46
PBM02452	ELIDAAAEIDKL PNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 47
PBM02453	ELIDAAAEIDKL PNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 48
PBM02454	ELIEAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 49
PBM02455	ELIEAAAREIDELPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 50
PBM02456	ELREAAEEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 51
PBM02457	ELVDAAREIDDLPNLRGQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 52
PBM02458	ELREAAAEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 53
PBM02459	ELIEAAAEIDKL PNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 54
PBM02460	ELREAAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 55
PBM02461	ELVRAAAEEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 56
PBM02462	ERSRAAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 57
PBM02463	ELIRAAAEIOKLPNLRQWNAFIKSLRD	SEC ID N°: 58

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC. ID NO
PBM02464	ELIKAAQEIDRLPNLNRRTQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 59
PBM02465	ELIEAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 60
PBM02466	ELIWAAGEIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 61
PBM02467	ERLAAAEEIDNLPNLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 62
PBM02468	ELRKAEEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 63
PBM02469	ELIAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 64
PBM02470	ERVKAEEIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 65
PBM02471	ELIHAAEEIDRLPNLNRNQNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 66
PBM02472	ELINAAGEIDKLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 67
PBM02473	ELIEAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 68
PBM02474	ELIAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 69
PBM02475	ERVDAAREIDNLPNLNREQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 70
PBM02476	ELRDAAREIDRLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 71
PBM02477	ELIAAAAEEIDRLPNLNRVQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 72
PBM02478	ELRAAAAEEIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 73
PBM02479	ELIWAAAEEIDRLPNLNRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 74
PBM02480	ELRAAAKEIDNLPNLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 75
PBM02481	ELVQAAKEIDNLPNLNRSQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 76
PBM02482	ELIEAAGEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 77
PBM02483	ELVKAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 78
PBM02484	ELREAAREIDSLPNLNRSQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 79
PBM02485	ELLEAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 80
PBM02486	ELVEAAREIDELPNLNRSQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 81
PBM02487	ELREAAAEEIDALPNLNRSQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 82
PBM02488	ELVRAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 83
PBM02489	ELRAAAAEEIDSLPNLNRGQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 84
PBM02490	ELIRAAREIDELPNLNRMQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 85
PBM02491	ELRDAAREIDSLPNLNRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 86
PBM02492	ELREAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 87

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PBM02493	ELIRAAEEIDKLPNLRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 88
PBM02494	ELLKAAAREIDELPNLNRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 89
PBM02495	ELIAAAAREIDGLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 90
PBM02496	ELVAAAAEIDGLPNLNRKQWNAFIHSLVD	SEC ID N°: 91
PBM02497	ELRDAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 92
PBM02498	ERINAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 93
PBM02499	ELRQAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 94
PBM02500	ELVEAAAEIDRL PNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 95
PBM02501	ELREAAAEIDRLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 96
PBM02502	ELIQAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 97
PBM02503	ERSMAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 98
PBM02504	ELVAAAREIDDLPNLNRKQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 99
PBM02505	ELVRAAEIIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 100
PBM02506	ELREAAAEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 101
PBM02507	ELVEAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 102
PBM02508	ELINAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 103
PBM02509	ELLSAAAEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 104
PBM02510	ELRDAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 105
PBM02511	ELRQAAAEIDKLPNLRQWNAFIQSLVD	SEC ID N°: 106
PBM02512	ELREAAAEIDALPNLNRVQWNAFIKSLRD	SEC ID N°: 107
PBM02513	ELVAAAEIIDRLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 108
PBM02514	ELIDAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 109
PBM02515	ERINAAAEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 110
PBM02516	ELVRAAEIIDLPNLRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 111
PBM02517	ELIRAAKEIOELPNLNRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 112
PBM02518	ELIQAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 113
PBM02519	ELIDAAAREIDDLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 114
PBM02520	ELLSKAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 115
PBM02521	ELLEAAAEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 116

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PBM02522	ELVDAAREIDTLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 117
PBM02523	ELIEAAREIDKLPNLRNQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 118
PBM02524	ELVAAAREIDNLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 119
PBM02525	ELVEAAAEIDGL PNLNRDQWNAFIKSLRD	SEC ID N°: 120
PBM02526	ELRNAAKEIDGLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 121
PBM02527	ELRHAAREIDGLPNLNRDQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 122
PBM02528	ELVEAAREIDTLPNLRNQWNAFIKSLRD	SEC ID N°: 123
PBM02529	ELVAAAAEIDALPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 124
PBM02530	ELRTAAKEIDDL PNLNRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 125
PBM02531	ELRAAREIDSLPNLNRDQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 126
PBM02532	ERIRAAAREIDALPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 127
PBM02533	ELRAAAEEIDRLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 128
PBM02534	ELIEAAAEEIDALPNLRKQWNAFISSLVD	SEC ID N°: 129
PBM02535	ERIEAAREIDELPNLRKQWNAFISSLVD	SEC ID N°: 130
PBM02536	ELAAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 131
PBM02537	ELINAAREIDELPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 132
PBM02538	ELVAAAEEIDALPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 133
PBM02539	ELIAAAKEIDELPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 134
PBM02540	ELISAAREIDKLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 135
PBM02541	ELREAAEEIDKLPNLRWQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 136
PBM0254 2	ELVEAAREIDGLPNLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 137
PBM02543	ELVAAAQEIDNLPNLRKQWNAFISSLVD	SEC ID N°: 138
PBM02544	ELRNAAAEIDKLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 139
PBM02545	ELIQAASEIDALPNLNRDQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 140
PBM0254 6	ELVEAAAEIDSLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 141
PBM02547	ERIAAAQEIDALPNLRNQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 142
PBM02548	ELRDAAKEIDSLPNLRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 143
PBM02549	ELVAAAKEIDKLPNLRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 144
PBM02550	ELIKAAREIDELPNLRKQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 145

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PBM02551	ELVEAAAEIDGLPMLNRNQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 146
PBM02552	ELLRAAEEDNLPMLNRAQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 147
PBM02553	ELIKAKEIDALPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 148
PBM02554	ELRRAAAEIDSLPMLNRDQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 149
PBM02555	ELVEAAAEIDGLPMLNRAQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 150
PBM02556	ELVEAAAEIDEIPMLNRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 151
PBM02557	ELVWAAAEIDRLPMLNRCQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 152
PBM02558	ERIRAAAEIDELPMLNREQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 153
PBM02559	ELRQAAKEIDALPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 154
PBM02560	ELREAAAEIDKLPMLNRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 155
PBM02561	ELRRAAEEDKLPMLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 156
PBM02562	ELVQAAAEIDALPMLNRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 157
PBM02563	ELRAAAAEIDALPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 158
PBM02564	ELRAAAAEIDKLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 159
PBM02565	ERIQAAKEIDELPMLNREQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 160
PBM02566	ELVAAAEEDKLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 161
PBM02568	ELVRAAEEDNLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 162
PBM02569	ELRTAAAEIDALPMLNREQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 163
PBM02570	ELVEAAAEIDALPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 164
PBM02571	ELIKAAEEDKLPMLNRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 165
PBM02572	ELREAAAEIDNLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 166
PBM02573	ELIEAAAEIDALPMLNRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 167
PBM02574	ELREAAQAEIDSLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 168
PBM02575	ELRSAAAEIDSLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 169
PBM02576	ELVEAAAEIDNLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 170
PBM02577	ELVEAAAGEIDNLPMLNRRQWNAFIRSLVD	SEC ID N°: 171
PBM02578	ELSKAAAEIDALPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 172
PBM02579	ELLWAAAGEIDRLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 173
PBM02580	ELRQAAAEIDGLPMLNRRQWNAFIKSLVD	SEC ID N°: 174

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PBM02831	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 175
PBM02832	ELVKAAAEIDALPNLRRQWNAFIKLLVD	SEC ID Nº: 176
PBM02833	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKLLVD	SEC ID Nº: 177
PBM02834	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKLLVK	SEC ID Nº: 178
PBM03358	ELIEAAAEIDALPNLTRRQWNAFIKLLVD	SEC ID Nº: 179
PB01976	KERAAEAQEIDQLPNLNRGQWNAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 180
PB01977	KERQAAAEEIDALPNLNRGQWNAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 181
PB01978	KELSDAAQEIOSLPNLNRSQWNAFIKSLIDDPQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 182
PB01979	KERREAAAEIDNLPNLNRSQWNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 183
PB01980	KERREAAKEIDSLPNLNRQTQWNAFIRSLADDPQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 184
PB01981	KELRHAASEIDDLPNLNRQWNAFIRSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 185
PB01982	KELVRAAQEIDELPNLNRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 186
PB01983	KEIKQAAREIDALPNLNKQWNAFIQSLADDPQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 187
PB01993	KERHRAAQEIDQLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 188
PB01994	KEIKFAAGEIDNLPNLNRKQWNAFIGSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 189
PB01995	KERLAAAEEIDALPNLNRKQWNAFISLRLDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 190
PB02417	KELRAAAAEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 191
PB02418	KERLEAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 192
PB02419	KELIKAAAEIDALPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 193
PB02420	KERHAAAREIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 194
PB02421	KELIKAAAEIDGLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 195
PB02422	KELVEAAAREIDS L PNLNRRQWNA FIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 196
PB02423	KELIKAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 197
PB02424	KELLA AAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 198
PB02425	KELINA AAEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 199
PB02426	KELVEAAAREIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 200
PB02427	KELRDA AAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 201
PB02428	KELSA AAEIDNLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 202
PB02429	KELISA AAEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 203

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02430	KELVDAAREIDELPNLNRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 204
PB02431	KELIEAAREIDALPNLNRSQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 205
PB02432	KELVEAAKEIDKLPNLRNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 206
PB02433	KELRQAAKEIDNLPNLRQAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 207
PB02434	KELVAAAREIDSLPNLNRQTQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 208
PB02435	KELRNAAKEIDSLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 209
PB02436	KELVQAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 210
PB02437	KELREAAEEIDNLPNLRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 211
PB02438	KELIEAAREIDNLPNLRQAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 212
PB02439	KELINAAAREIDGLPNLNRMQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 213
PB02440	KERIAAAQEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 214
PB02441	KELINAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 215
PB02442	KERSHAAQEIDALPNLNRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 216
PB02443	KELIAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 217
PB02444	KERIRAAEEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 218
PB02445	KELVQAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 219
PB02446	KERREAAREIDNLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 220
PB02447	KELRWAAAGEIDKLPNLRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 221
PB02448	KELSRAAEEIDRLPNLNRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 222
PB02449	KELIEAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 223
PB02450	KELIAAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 224
PB02451	KERVRAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 225
PB02452	KELIDAAAEIDKLPNLRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 226
PB02453	KELIDAAAEIDKLPNLRSQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 227
PB02454	KELIEAAREIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 228
PB02455	KELIEAAREIDELPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 229
PB02456	KELREAAEEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 230
PB02457	KELVDAAREIDDLPNLNRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 231
PB02458	KELREAMEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 232

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02459	KELIEAAAEIDKLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 233
PB02460	KELREAAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 234
PB02461	KELVRAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 235
PB02462	KERSRAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 236
PB02463	KELIRAAEIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 237
PB02464	KELIKAAAGEIDRLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 238
PB02465	KELIEAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 239
PB02466	KELIWAAGEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 240
PB02467	KERLAAAEIIDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 241
PB02468	KELRKAEEIIDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 242
PB02469	KELIAAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNOAQ	SEC ID N°: 243
PB02470	KERVKAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 244
PB02471	KELIHAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 245
PB02472	KELINAAAGEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 246
PB02473	KELIEAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 247
PB02474	KELIAAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 248
PB02475	KERVDAAREIDLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 249
PB02476	KELRDAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 250
PB02477	KELIAAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 251
PB02478	KELRAAAEEIIDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 252
PB02479	KELIWAAAEIDRLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 253
PB02480	KELRAAAKEIDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 254
PB02481	KELVQAAKEIDLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 255
PB02482	KELIEAAGEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 256
PB02483	KELVKAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 257
PB02484	KELREAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 258
PB02485	KELLEAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 259
PB02486	KELVEAAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 260
PB02487	KELREAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 261

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02488	KELVRAAEEIDRLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 262
PB02489	KELRAAAAEEIDSLPNLNRRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 263
PB02490	KELRAAAREIDELPNLNRMQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 264
PB02491	KELRDAAREIDSLPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 265
PB02492	KELREAAAREIDELPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 266
PB02493	KELRAAEEIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 267
PB02494	KELKAAREIDELPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 268
PB02495	KELIAAAREIDGLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 269
PB02496	KELVAAAAREIDGLPNLNRRQWNAFIHSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 270
PB02497	KELRDAAREIDALPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 271
PB02498	KERINAAKEIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 272
PB02499	KELRQAAAEIDALPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 273
PB02500	KELVEAAAAREIDRLPNLNRRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 274
PB02501	KELREAAAAREIDRLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 275
PB02502	KELIQAAAKEIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 276
PB02503	KERSMAAKEIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 277
PB02504	KELVAAAAREIDDLPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 278
PB02505	KELVRAAEEIDRLPNLNRLQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 279
PB02506	KELREAAAAREIDDLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 280
PB02507	KELVEAAAKEIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 281
PB02508	KELINAAGEIDRLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 282
PB02509	KELLSAAAAREIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 283
PB02510	KELRDAAAAREIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 284
PB02511	KELRQAAAREIDKLPNLNRSQWNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 285
PB02512	KELREAAAAREIDALPNLNRVQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKL1DAQ	SEC ID N°: 286
PB02513	KELVAAAAREIDRLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 287
PB02514	KELIDAAAAREIDKLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 288
PB02515	KERINAAREIDGLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 289
PB02516	KELVRAAEEIDNLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 290

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02517	KELIRAAKEIDELPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 291
PB02516	KELIQAAREIDSLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 292
PB02519	KELIDAAAREIDDLNPNLRQWNAFIKSLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 293
PB02520	KELKAADEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 294
PB02521	KELLEAAAIDSPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 295
PB02522	KELVDAAREIDTLPNLNRRQWNAFISLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 296
PB02523	KELIEAAREIDKLPNLNRRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 297
PB02524	KELVAAAAREIDNLPNLNRRQWNAFISLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 298
PB02525	KELVEAAAEEIDGLPNLNRDQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 299
PB02526	KELRNAAKEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 300
PB02527	KELRHAAREIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 301
PB02528	KELVEAAREIDTLPNLNRRQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 302
PB02529	KELVAAAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 303
PB02530	KELRTAAKEIDDLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 304
PB02531	KELLRAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 305
PB02532	KERIRAAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 306
PB02533	KELRAAAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 307
PB02534	KELIEAAAAREIDALPNLNRKQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 308
PB02535	KERIEAAREIDELPNLNRKQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 309
PB02536	KELVAAAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 310
PB02537	KELINAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 311
PB02538	KELVAAAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 312
PB02539	KELIAAAAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 313
PB02540	KELISAAAAREIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 314
PB02541	KELREAAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 315
PB02542	KELVEAAREIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 316
PB02543	KELVAAAAREIDNLPNLNRKQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 317
PB02544	KELRNAAAAAREIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 318
PB02545	KELIQAASEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 319

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02546	KELVEAAAEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 320
PB02547	KERIAAAQEIDALPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 321
PB02548	KELRDAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 322
PB02549	KELVAAAKEIDKLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 323
PB02550	KELIKAAREIDELPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 324
PB02551	KELVEAAASEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 325
PB02552	KELVRAAEEIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 326
PB02553	KELIKAAKEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 327
PB02554	KELRRAAAEIDSLPNLNRDQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 328
PB02555	KELVEAAAREIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 329
PB02556	KELVEAAAREIDELPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 330
PB02557	KELVWAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 331
PB02558	KERIRAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 332
PB02559	KELRQAAKEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 333
PB02560	KELVRAAEEIDKLPNLNRKQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 334
PB02561	KELRRAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 335
PB02562	KELVQAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 336
PB02563	KELVRAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 337
PB02564	KELVRAAEEIDKLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 338
PB02565	KERIQAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 339
PB02566	KELVAAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 340
PB02568	KELVRAAEEIDNLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 341
PB02569	KELRTAAAEIDALPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 342
PB02570	KELVEAAAEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 343
PB02571	KELIKAAEEIDKLPNLNRMQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 344
PB02572	KELVRAAEEIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 345
PB02573	KELVIAAREIDALPNLNRKQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 346
PB02574	KELVRAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 347
PB02575	KELVRAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 348

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
PB02576	KELVEAAAEIDNLPNLRMQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 349
PB02577	KELVEAAGEIDNLPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 350
PB02578	KELSKAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 351
PB02579	KELWAAGEIDRLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 352
PB02580	KELRQAAAEIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQ	SEC ID N°: 353
PB02831	KELVKAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSDQ	SEC ID N°: 354
PB02832	KELVKAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSDQ	SEC ID N°: 355
PB02833	KELVKAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSDQ	SEC ID N°: 356
PB02834	KELVKAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSDQ	SEC ID N°: 357
PB03358	KELIEAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSDQ	SEC ID N°: 358
Z01976	VDNKFNKEREAQAQAEIDQLPNLRGQWNAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 359
Z01977	VDNKFNKERQVAQAQAEIDALPNLRGQWNAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 360
Z01978	VDNKFNKELSDAAQAEIDSLPNLRQWNAFIKSLIDDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 361
Z01979	VDNKFNKERREAAQAQAEIDNLPNLRQWNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 362
Z01980	VDNKFNKERREAAQAQAEIDSLPNLRQWNAFIRSLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 363
Z01981	VDNKFNKELRHAQAQAEIDDLPNLRQWNAFIRSLRDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 364
Z01982	VDNKFNKELVRAQAQAEIDELPNLRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 365
Z01983	VDNKFNKEIKGAQAQAEIDALPNLRQWNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 366
Z01993	VDNKFNKERHRAQAQAEIDQLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 367
Z01994	VDNKFNKEIKFAQAQAEIDNLPNLRQWNAFIGSLRDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 368
Z01995	VDNKFNKERLKAQAQAEIDALPNLRQWNAFISSLRDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 369
Z02417	VDNKFNKELRAQAQAEIDSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 370
Z02418	VDNKFNKERLEAQAQAEIDSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 371
Z02419	VDNKFNKELIKAAQAQAEIDALPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 372
Z02420	VDNKFNKERIHAAQAQAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 373
Z02421	VDNKFNKELIKAAQAQAEIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 374
Z02422	VDNKFNKELVEAQAQAE1DSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 375
Z02423	VDNKFNKELIKAAQAQAEIDELPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 376
Z02424	VDNKFNKELLAQAQAEIDSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 377

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02425	VDNKFNKELINAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 378
Z02426	VDNKFNKELVEAAKEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 379
Z02427	VDNKFNKELRDAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 380
Z02428	VDNKFNKELSAAAAREIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 381
Z02429	VDNKFNKELISAAEIEDLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 382
Z02430	VDNKFNKELVDAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 383
Z02431	VDNKFNKELIEAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 384
Z02432	VDNKFNKELVEAAKEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 385
Z02433	VDNKFNKELRQAAKEIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 386
Z02434	VDNKFNKELVAAAAREIDSPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 387
Z02435	VDNKFNKELRNAAKEIDSPLNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 388
Z02436	VDNKFNKELVQAAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 389
Z02437	VDNKFNKELREAAEIEDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 390
Z02438	VDNKFNKELIEAAREIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 391
Z02439	VDNKFNKELINAAREIDGLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 392
Z02440	VDNKFNKERIAAAQEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 393
Z02441	VDNKFNKELINAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 394
Z02442	VDNKFNKERSHAAQEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 395
Z02443	VDNKFNKELIAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 396
Z02444	VDNKFNKERIRAAEIIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 397
Z02445	VDNKFNKELVQAAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 398
Z02446	VDNKFNKERRAAAREIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 399
Z02447	VDNKFNKELRWAAGEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 400
Z02448	VDNKFNKELSRAAEIEDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 401
Z02449	VDNKFNKELIEAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 402
Z02450	VDNKFNKELIAAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 403
Z02451	VDNKFNKERVRAAEIDSPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 404
Z02452	VDNKFNKELIDAAAEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 405
Z02453	VDNKFNKELIDAAAEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 406

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02454	VDNKFNKELEAAEEIDRLPNLNRQQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 407
Z02455	VDNKFNKELEAAAREIDELPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 408
Z02456	VDNKFNKELEAAEEIDSLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 409
Z02457	VDNKFNKELVDAAREIDDLPNLNRGQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 410
Z02458	VDNKFNKELEAAAEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 411
Z02459	VDNKFNKELEAAAEIDKLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 412
Z02460	VDNKFNKELEAAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 413
Z02461	VDNKFNKELVRAAEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 414
Z024 62	VDNKFNKERSRAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 415
Z02463	VDNKFNKELEIRAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLRDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 416
Z02464	VDNKFNKELEKAAQEIDRLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 417
Z02465	VDNKFNKELEAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 418
Z02466	VDNKFNKELEWAAGEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 419
Z02467	VDNKFNKERLAAAEIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 420
Z024 68	VDNKFNKELEKAAEEIDALPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 421
Z02469	VDNKFNKELEAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 422
Z02470	VDNKFNKERVKAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 423
Z02471	VDNKFNKELEHAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 424
Z02472	VDNKFNKELENAAGEIDKLPNLNRKQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 425
Z02473	VDNKFNKELEAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 426
Z02474	VDNKFNKELEAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 427
Z02475	VDNKFNKERVDAAREIDNLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 428
Z02476	VDNKFNKELEDAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 429
Z02477	VDNKFNKELEAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 430
Z02478	VDNKFNKELERAAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 431
Z02479	VDNKFNKELEWAAAEIDRLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 432
Z02480	VDNKFNKELERAAAKEIDNLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 433
Z02481	VDNKFNKELEVQAAKEIDNLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 434
Z02482	VDNKFNKELEAAAGEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 435

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02483	VDNKFNKELVKAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 436
Z02484	VDNKFNKELREAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 437
Z02485	VDNKFNKELLEAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 438
Z02486	VDNKFNKELVEAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 439
Z02487	VDNKFNKELREAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 440
Z02488	VDNKFNKELVRAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 441
Z02489	VDNKFNKELRAAAAEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 442
Z02490	VDNKFNKELIRAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 443
Z02491	VDNKFNKELDAAREIDSLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 444
Z02492	VDNKFNKELREAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 445
Z02493	VDNKFNKELIRAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 446
Z02494	VDNKFNKELKAAREIDELPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 447
Z02495	VDNKFNKELIAAREIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 448
Z02496	VDNKFNKELVAAAEEIDGLPNLNRQWNAFIHSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 449
Z024 97	VDNKFNKELDAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 450
Z02498	VDNKFNKERINAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 451
Z02499	VDNKFNKELRQAAAEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 452
Z02500	VDNKFNKELVEAAREIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 453
Z02501	VDNKFNKELREAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 454
Z02502	VDNKFNKELIQAAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 455
Z02503	VDNKFNKERSMAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 456
Z02504	VDNKFNKELVAAAEEIDDLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 457
Z02505	VDNKFNKELVRAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 458
Z02506	VDNKFNKELREAAAEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 459
Z02507	VDNKFNKELVEAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 460
Z02508	VDNKFNKELINAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 461
Z02509	VDNKEWELLSAAAEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 462
Z02510	VDNKFNKELDAAAAEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 463
Z02511	VDNKFNKELRQAAAEIDKLPNLNRQWNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 464

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02512	VDNKFMEELPXAAREIDALPNLNRVQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 465
Z02513	VDNKFNKELVAAAEEIDRLPNLNRQAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 466
Z02514	VDNKFNKELIDAAAEEIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 467
Z02515	VDNKFNKERINAAAEEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 468
Z02516	VDNKFVKELVRAAAEEIDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 469
Z02517	VDNKFNKELIPAAKEIDELPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 470
Z02518	VDNKFNKELIQAAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 471
Z02519	VDNKFNKELIDAAAREIDLPNLNRQWNAFIKSLDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 472
Z02520	VDNKFNKELLKAADEIDALPNLNRQAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 473
Z02521	VDNKFNKELLEAAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 474
Z02522	VDNKFNKELVDAAREIDTLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 475
Z02523	VDNKFNKELIEAAREIDKLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 476
Z02524	VDNKFNKELVAAAAREIDLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 477
Z02525	VDNKFNKELVEAAAEEIDGLPNLNRDQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 478
Z02526	VDNKFNKELRNAAKEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 479
Z02527	VDNKFNKELRHAAREIDGLPNLNRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 480
Z02528	VDNKFNKELVEAAREIDTLPNLNRQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 481
Z02529	VDNKFNKELVAAAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 482
Z02530	VDNKFNKELRTAAKEIDDLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 483
Z02531	VDNKFNKELRAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 484
Z02532	VDNKFNKERIRAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 485
Z02533	VDNKFNKELRAAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 486
Z02534	VDNKFNKELIEAAAEEIDALPNLNRQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 487
Z02535	VDNKFNKERIEAAREIDELPNLNRQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 488
Z02536	VDNKFNKELLAAAKEIDELPNLNRQAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 489
Z02537	VDN"KFNKELINAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 490
Z02538	VDNKFNKELVKAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 491
Z02539	VDNKFNKELIAAAKEIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 492
Z02540	VDNKFNKELISAAREIDKLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 493

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02541	VDNKFNKELREAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 494
Z02542	VDNKFNKELVEAAAREIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 495
Z02543	VDNKFNKELVAAAQAEIDNLPNLRQWNAFISSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 496
Z02544	VDNKFNKELRNAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 497
Z02545	VDNKFNKELIQAASEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 498
Z02546	VDNKFNKELVEAAAIDSPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 499
Z02547	VDNKFNKERIAAAQAEIDALPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 500
Z02548	VDNKFNKELRDAAKEIDSPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 501
Z02549	VDNKFNKELVAAAKEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 502
Z02550	VDNKFNKELIKAAREIDELPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 503
Z02551	VDNKFNKELVEAAASEIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 504
Z02552	VDNKFNKELRAAEEIDNLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 505
Z02553	VDNKFNKELIKAKEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 506
Z02554	VDNKFNKELRRAAAEIDSPLNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 507
Z02555	VDNKFNKELVEAAAREIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 508
Z02556	VDNKFNKELVEAAAREIDELPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 509
Z02557	VDNKFNKELWAAAEEIDRLPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 510
Z02558	VDNKFNKERIRAAREIDELPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 511
Z02559	VDNKFNKELRQAAKEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 512
Z02560	VDNKFNKELREAAEIDKLPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 513
Z02561	VONKFNKELRRAAEEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 514
Z02562	VDNKFNKELVQAAREIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 515
Z02563	VDNKFNKELRAAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 516
Z02564	VDNKFNKELRAAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 517
Z02565	VDNKFNKERIAAAKEIDELPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 518
Z02566	VDNKFNKELVAAAEEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 519
Z02568	VDNKFNKELVRAAEEIDNLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 520
Z02569	VDNKFNKELRTAAAEEIDALPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 521
Z02570	VDNKFNKELVEAAAEEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK	SEC ID N°: 522

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°
Z02571	VDNKFNKELIKAAEEIDKLPNLRMQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 523
Z02572	VDNKFNKELEAAAEIDNLPNLRQWNAFIKSLIDDPQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 524
Z02573	VDNKFWEIEAAREIDALPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 525
Z02574	VDNKFNKELEAAAEIDSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 526
Z02575	VDNKFNKELEAAAEIDSLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 527
Z02576	VDNKFNKELEAAAEIONLPNLRMQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 528
Z02577	VDNKFNKELEAAAEIDNLPNLRQWNAFIRSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 529
Z02578	VDNKFNKELEAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 530
Z02579	VDNKFNKELEAAAEIDRPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 531
Z02580	VDNKFNKELEAAAEIDGLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 532
Z02831	VDKFAKELVAAAEEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 533
Z02832	VDKFAKELVAAAEEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 534
Z02833	VDKFAKELVAAAEEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 535
Z02834	VDKFAKELVAAAEEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 536
Z03558	AEAKYAKELIEAAAEIDALPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 537
Z00000	VDNKFNKEQQNAFYEILHLPNLNEEQRNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK	SEC ID N°: 538

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID N°:
PDGF-Rβ	MRLPGAMPAL ALKGELLLS LLLLEPQIS QGLVTPPGP ELVNVSTF VLTCSGAPV VWERMSQEPQ QEMAKAQDGT FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV PDPTVGFNPAEAEELFIFLT EITEITIPCR VTDPLQVVTL HEKKGVALP VPYDHQRGFS GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYVYRLQ VSSINVSNA VQTVRQGEN ILMCIVIGN EVNFEWYTP RKESGRLEVP VTDFLLDMPY HRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH QDEKAINITV VESGYVRLG EGVTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKNRTLGDG SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFQ LQINVPVRVL ELSESHPDG EQTVRCRGRG MPQNIWISA CRDLKRCPRE LPPTLLGNS EESQLETNV TYWEEEQEFE VVSTLRLOHV DRPLSVRCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF KVVVISAILA LVVLTIIISLI ILIMLQKPK RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPMLPYD STWELPRDQL VLGRTLGSGA FGQVVEATAH GLSHSQATMK VAVKMLKSTA RSSEKQALMS ELKIMSHLGP HLNVNLLGA CTGGPLYII TEYCRYGDLV DYIHRNKHTE LQHSDKRRP PSAELYSNAL PVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMSKDESVD YVPMLDMKGD VKYADIESSN YMAPYDNYVP SAPERTCRAT LINESPVLSY MDLVGFSYQV ANGMFLASK NCVHROLAAR NVLICEGKLV KICDFGLARD IMRDSNYISK GSTFLPKWM APESIFNSLY TTLSDVWSFG ILLWEIFTLG GTPYPELPMN EQFYNAIKRG YRMAQPAHAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQVLLLER LLGEGYKKKY QQVDEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGDND YIIPDPKX EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISC DSPLEPQDEP EPEPQLELQV EPEPELEQLP DSGCPAPRAE AEDSFL	SEC ID N°: 539
PDGF-RβEC	VVTPPGP ELVNVSTF VLTCSGAPV VWERMSQEPQ QEMAKAQDGT FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV PDPTVGFNPAEAEELFIFLT EITEITIPCR VTDPLQVVTL HEKKGVALP VPYDHQRGFS GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYVYRLQ VSSINVSNA VQTVRQGEN ILMCIVIGN EVNFEWYTP RKESGRLEVP VTDFLLDMPY HRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH QDEKAINITV VESGYVRLG EGVTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLW FKNRTLGDG SAGEIALSTR NVSETRYVSE LTLVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFQ LQINVPVRVL ELSESHPDG EQTVRCRGRG MPQNIWISA CRDLKRCPRE LPPTLLGNS EESQLETNV TYWEEEQEFE VVSTLRLOHV DRPLSVRCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF K	SEC ID N°: 540

Figura 1

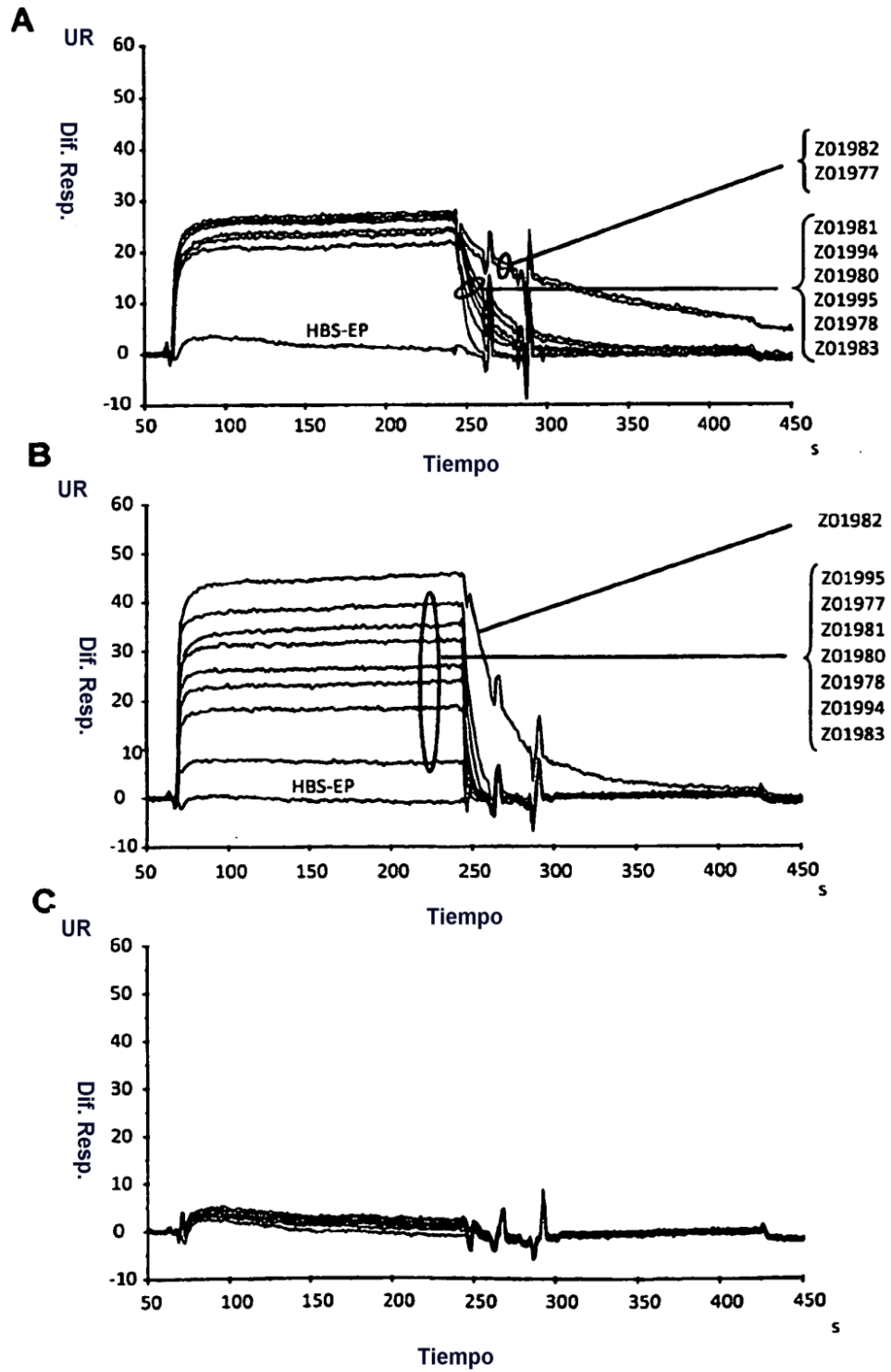


Figura 2

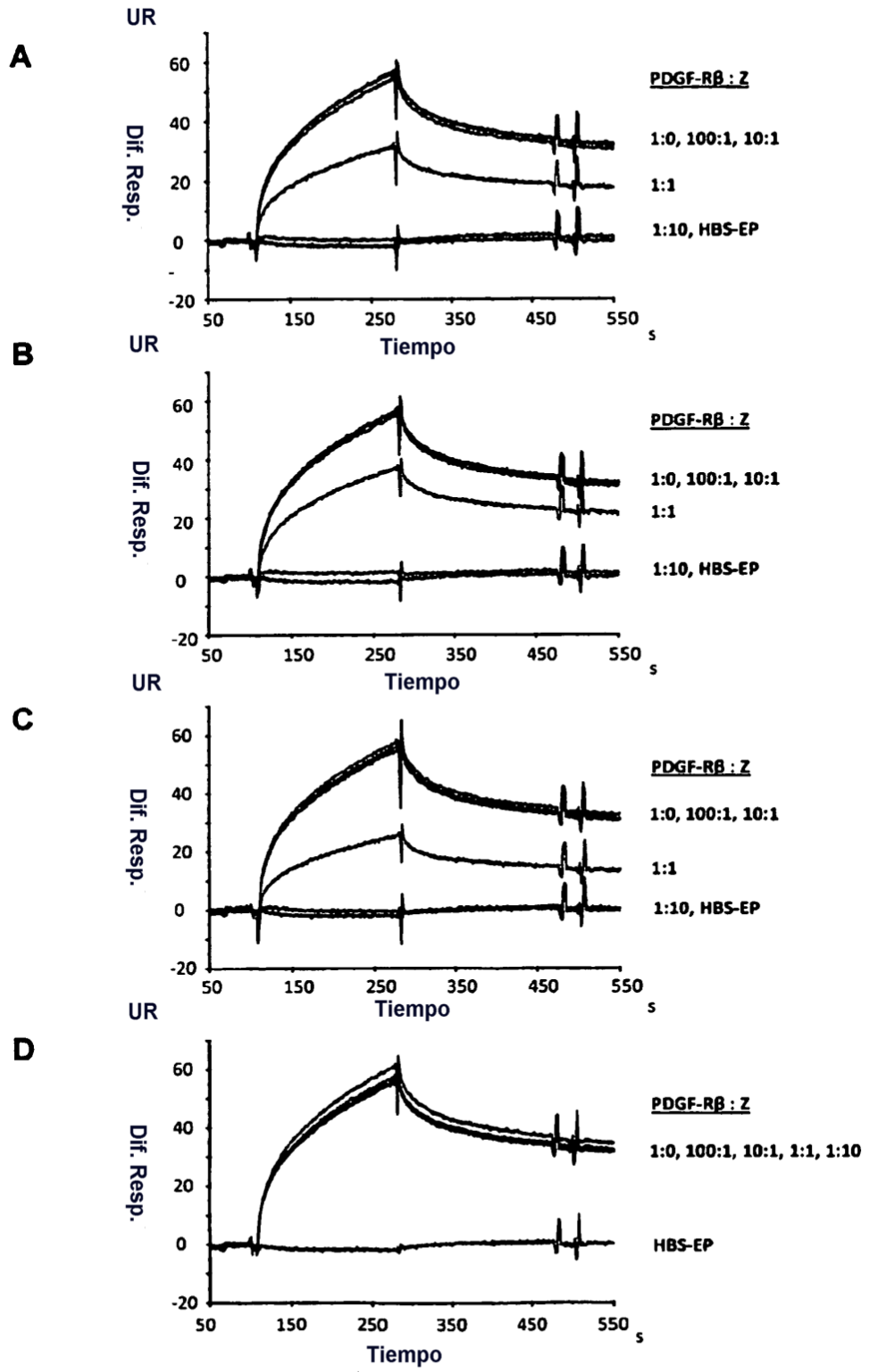
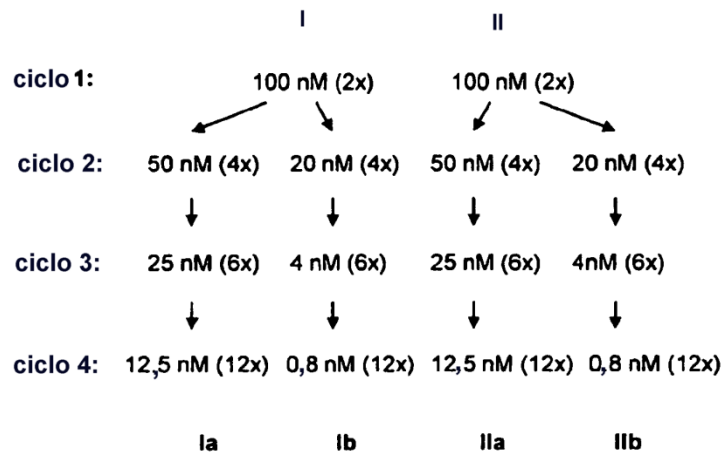


Figura 3

A



B

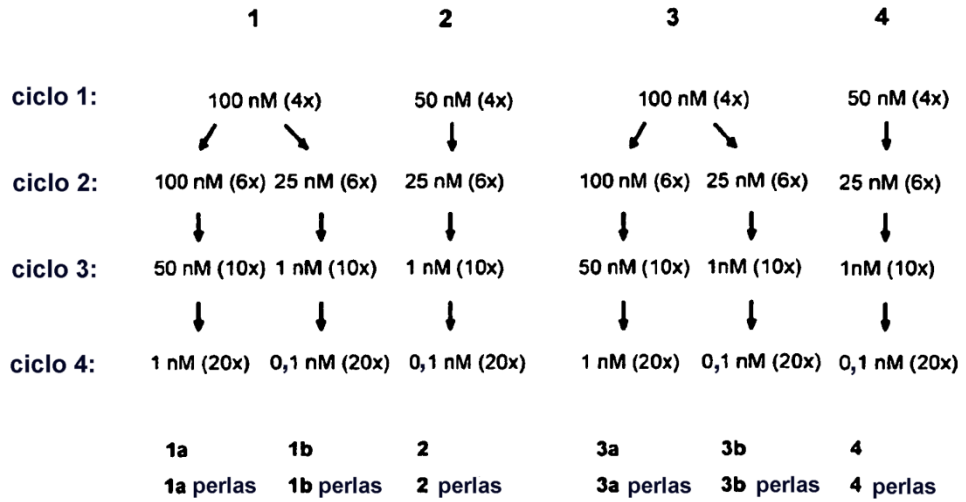


Figura 4

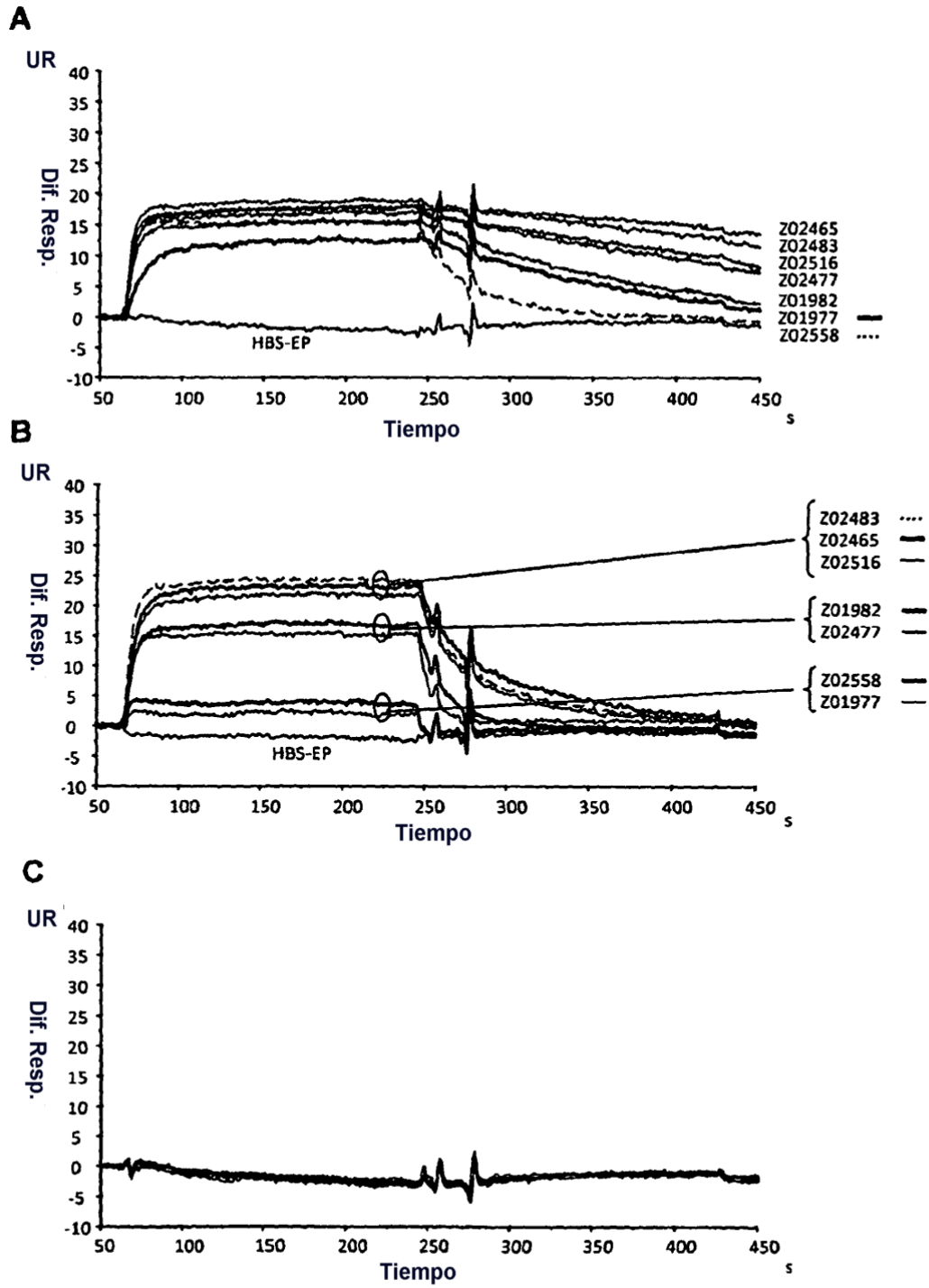


Figura 5

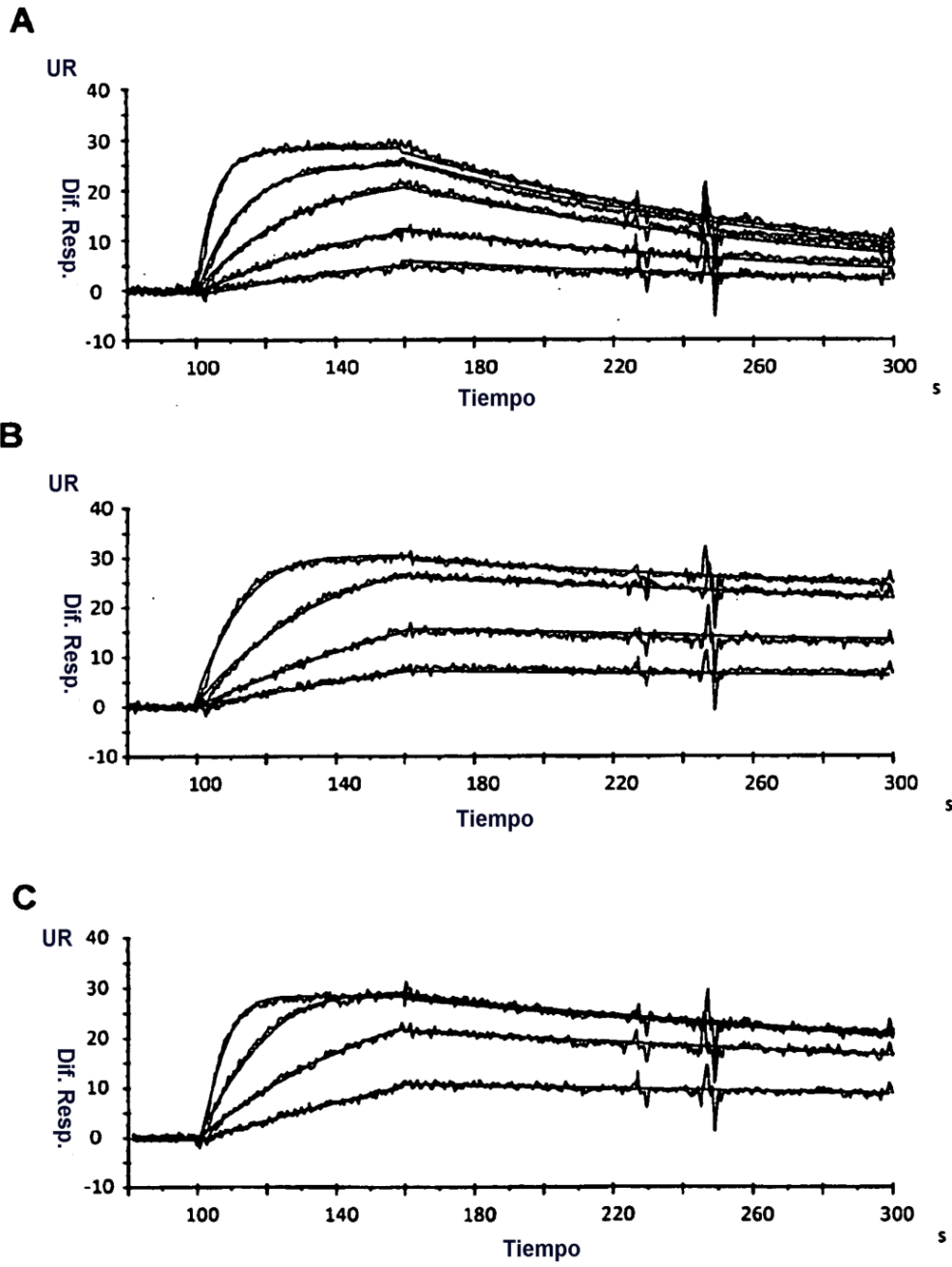


Figura 6

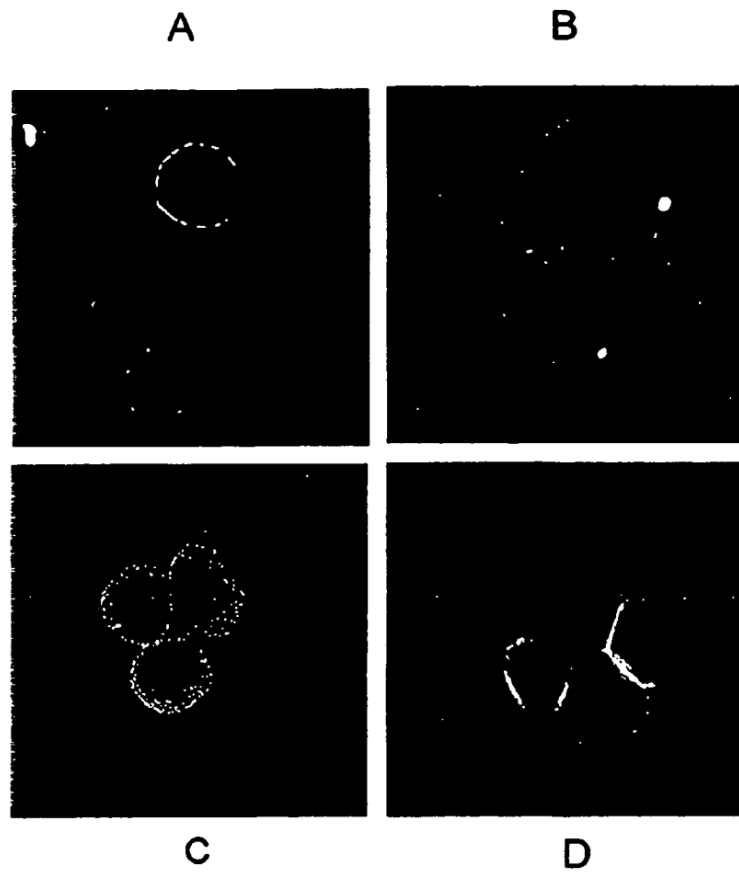


Figura 7

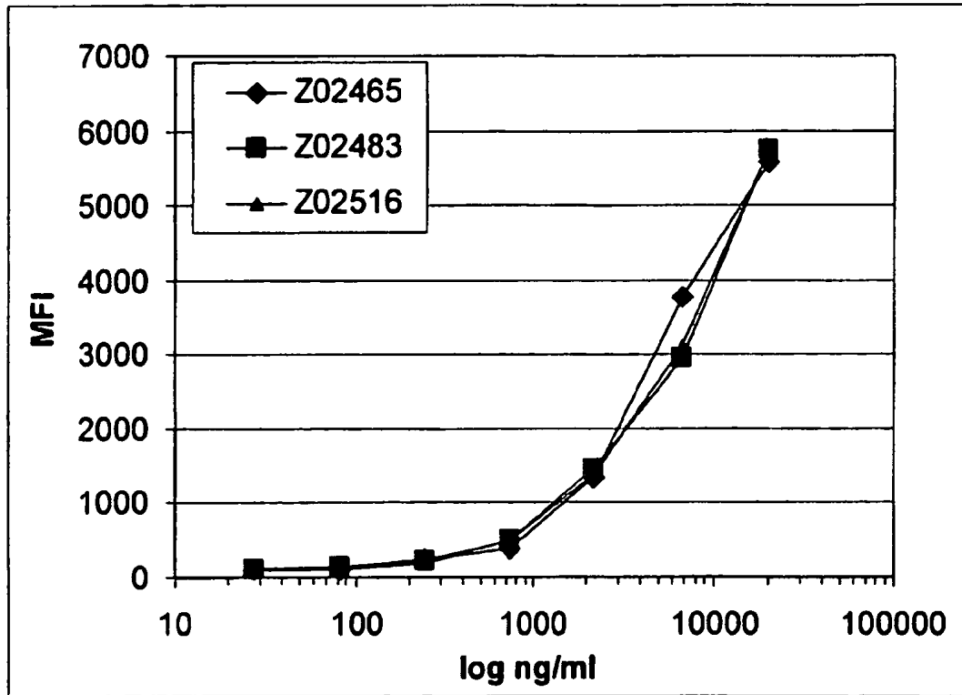


Figura 8