

(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

(73) Titular/es:

**AFFIBODY AB  
BOX 20137  
161 02 BROMMA, SE**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**09.02.2012**

(72) Inventor/es:

**LINDBORG, Malin;  
GUNNERIUSSON, Elin y  
LENDEL, Christofer**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**09.02.2012**

(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**

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

**Antecedentes**

El receptor de factor de crecimiento derivado de plaquetas beta (PDGF-R $\beta$ ) 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 $\beta$  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.

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

Están en desarrollo clínico anticuerpos que bloquean el efecto de PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ , que podrían por ejemplo usarse para diagnóstico, formación de imágenes *in vitro* o *in vivo* y aplicaciones terapéuticas.

**Sumario de la invención**

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 $\beta$ ), 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) EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>AAX<sub>7</sub>EID X<sub>11</sub>LPNLX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>QW NAFIX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>LX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>, en la que, de forma independiente entre sí,

X<sub>2</sub> se selecciona de L, R y I;

X<sub>3</sub> se selecciona de R, I, L, V, K, Q, S, H, y A;

X<sub>4</sub> se selecciona de A, R, N, D, Q, E, H, K, M, S, T, W, F y V;

X<sub>7</sub> se selecciona de A, R, D, Q, E, G, K y S;

X<sub>11</sub> se selecciona de A, R, N, D, E, G, K, S, T y Q;

X<sub>16</sub> se selecciona de N y T;

X<sub>17</sub> se selecciona de R y K;

X<sub>18</sub> se selecciona de A, R, N, D, C, Q, E, G, L, K, M, S, T, W y V;

X<sub>25</sub> se selecciona de K, R, Q, H, S, G y A;

X<sub>26</sub> se selecciona de S y K;

X<sub>28</sub> se selecciona de V, R, I, L y A;

X<sub>29</sub> se selecciona de D y K; y

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 $\beta$  se une a PDGF-R $\beta$  tal de modo que el valor K<sub>D</sub> de la interacción es como máximo 1 x 10<sup>-6</sup> M.

La definición anterior de una clase de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  en experimentos de selección. El motivo de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ .

Como entenderá el experto en la materia, la función de cualquier polipéptido, tal como la capacidad de unión de PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  ha conducido a la identificación de secuencias de motivo de unión a PDGF-R $\beta$  (*PBM*) individuales. Estas secuencias constituyen realizaciones individuales de la secuencia de *PBM* i) en la definición de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$  de acuerdo con este aspecto de la presente invención. Las secuencias de motivos de unión a PDGF-R $\beta$  individuales se presentan en la Figura 1 y como SEC ID Nº: 1-179. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, la secuencia de *PBM* i) se selecciona de una cualquiera de SEC ID Nº: 2-3, SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 11-12, SEC ID Nº: 18-19, SEC ID Nº: 38, SEC ID Nº: 42, SEC ID Nº: 44, SEC ID Nº: 47, SEC ID Nº: 60-62, SEC ID Nº: 64, SEC ID Nº: 67-68, SEC ID Nº: 71-72, SEC ID Nº: 78, SEC ID Nº: 80-81, SEC ID Nº: 83, SEC ID Nº: 86, SEC ID Nº: 91-92, SEC ID Nº: 94-97, SEC ID Nº: 101-103, SEC ID Nº: 105, SEC ID Nº: 109, SEC ID Nº: 111, SEC ID Nº: 116, SEC ID Nº: 119, SEC ID Nº: 133, SEC ID Nº: 137, SEC ID Nº: 139-140, SEC ID Nº: 149, SEC ID Nº: 153, SEC ID Nº: 160, SEC ID Nº: 164, SEC ID Nº: 170, SEC ID Nº: 174 y SEC ID Nº: 179.
- 30 En una realización, el polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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
- 35 En una realización, el polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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

EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>AAX<sub>7</sub>EID X<sub>11</sub>LPNLX<sub>16</sub>RX<sub>18</sub>QW NAFIX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>LX<sub>28</sub>D,

en la que, independientemente entre sí,

- 40 X<sub>2</sub> se selecciona de L y R;
- X<sub>3</sub> se selecciona de R, I, L, V, Q y S;
- X<sub>4</sub> se selecciona de A, R, D, E, K y V;
- X<sub>7</sub> se selecciona de A, Q y K;
- X<sub>11</sub> se selecciona de A, R, E y S;
- X<sub>16</sub> se selecciona de N y T;
- 45 X<sub>18</sub> se selecciona de R, G, K, S, T y V;
- X<sub>25</sub> se selecciona de K, R, S y A;
- X<sub>26</sub> se selecciona de S y K;
- X<sub>28</sub> se selecciona de V, R, I y A.

La secuencia de aminoácidos del *PBM* puede por ejemplo seleccionarse de una cualquiera de SEC ID Nº: 2-3, SEC ID Nº: 5, SEC ID Nº: 7, SEC ID Nº: 11, SEC ID Nº: 60, SEC ID Nº: 72, SEC ID Nº: 78, SEC ID Nº: 111 y SEC ID Nº: 153.

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 $\beta$  de acuerdo con la invención puede comprender en particular una secuencia de aminoácidos seleccionada de:

- i) K-[PBM]-DPSQSX<sub>a</sub>X<sub>b</sub>LLX<sub>c</sub>EAKKLNDX<sub>d</sub>Q;  
en la que  
[PBM] es un motivo de unión a PDGF-R $\beta$  como se ha definido anteriormente;  
X<sub>a</sub> se selecciona de A y S;  
X<sub>b</sub> se selecciona de N y E;  
X<sub>c</sub> se selecciona de A y S;  
X<sub>d</sub> 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.

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 Nº: 180-358. En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, la secuencia de aminoácidos i) puede seleccionarse de una cualquiera de SEC ID Nº: 181-182, SEC ID Nº: 184, SEC ID Nº: 186, SEC ID Nº: 190-191, SEC ID Nº: 197-198, SEC ID Nº: 217, SEC ID Nº: 221, SEC ID Nº: 223, SEC ID Nº: 226, SEC ID Nº: 239-241, SEC ID Nº: 243, SEC ID Nº: 246-247, SEC ID Nº: 250-251, SEC ID Nº: 257, SEC ID Nº: 259-260, SEC ID Nº: 262, SEC ID Nº: 265, SEC ID Nº: 270-271, SEC ID Nº: 273-276, SEC ID Nº: 280-282, SEC ID Nº: 284, SEC ID Nº: 288, SEC ID Nº: 290, SEC ID Nº: 295, SEC ID Nº: 298, SEC ID Nº: 312, SEC ID Nº: 316, SEC ID Nº: 318-319, SEC ID Nº: 328, SEC ID Nº: 332, SEC ID Nº: 339, SEC ID Nº: 343, SEC ID Nº: 343, SEC ID Nº: 349, SEC ID Nº: 353 y SEC ID Nº: 358, y puede en particular seleccionarse de una cualquiera de SEC ID Nº: 181-182, SEC ID Nº: 184, SEC ID Nº: 186, SEC ID Nº: 190, SEC ID Nº: 239, SEC ID Nº: 251, SEC ID Nº: 257, SEC ID Nº: 290, SEC ID Nº: 332 y SEC ID Nº: 358.

En realizaciones particulares de la invención dicho domino 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.

Por lo tanto, un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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);

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

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

AQHDE-[PBM]-DPSQSANVLGEAQKLNDSQAPK (*PBM* dentro del dominio E de proteína A estafilocócica); VDNKFNK-[PBM]-DPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK (*PBM* dentro del derivado de proteína Z del dominio B de la *Staphylococcus aureus*).

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

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 $\beta$  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 de SEC ID N°: 359-537. La secuencia de aminoácidos puede por ejemplo comprender una secuencia

seleccionada de SEC ID Nº: 360-361, SEC ID Nº: 363, SEC ID Nº: 365, SEC ID Nº: 369-370, SEC ID Nº: 376-377, SEC ID Nº: 396, SEC ID Nº: 400, SEC ID Nº: 402, SEC ID Nº: 405, SEC ID Nº: 418-420, SEC ID Nº: 422, SEC ID Nº: 425-426, SEC ID Nº: 429-430, SEC ID Nº: 436, SEC ID Nº: 438-439, SEC ID Nº: 441, SEC ID Nº: 444, SEC ID Nº: 449-450, SEC ID Nº: 452-455, SEC ID Nº: 459-461, SEC ID Nº: 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.

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

10 Los polipéptidos de acuerdo con la invención son ventajosos porque se unen bien a PDGF-R $\beta$ . Los polipéptidos pueden en particular unirse al domino extracelular de PDGF-R $\beta$ . 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 15 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.

20 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 $\beta$  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 25 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 30 proporcionar un "marcador" para purificación o detección del polipéptido tal como un marcador His<sub>6</sub> o un marcador "myc" (c-myc) o un marcador "FLAG" para interacción con anticuerpos específicos para el marcador.

35 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 $\beta$ , 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 $\beta$  como se ha descrito anteriormente está presente como un dominio de unión a PDGF-R $\beta$  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 40 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.

45 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.

50 En una realización específica de la presente invención, el polipéptido se une al mismo epítopo que PDGF-BB, o suficientemente cercano a él para bloquear la unión del ligando PDGF-BB a PDGF-R $\beta$ . El polipéptido puede por ejemplo usarse para inhibir la señalización celular uniéndose a un PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  puede estimular la activación del receptor proporcionando dimerización del receptor.

55 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 $\beta$ , 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 diméricas. Una forma dimérica 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$ . 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 $\beta$  de acuerdo con la invención para su uso como un medicamento, por ejemplo para tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R $\beta$ . En este caso, el polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  de la invención se usa *in vivo* para obtener un efecto terapéutico, por ejemplo inhibiendo la señalización celular por unión a un PDGF-R $\beta$  en una superficie celular. Se proporciona también un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  para su uso en diagnóstico, tal como en el diagnóstico de una afección relacionada con PDGF-R $\beta$ .

En otros aspectos de la invención, los polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  pueden usarse en la dirección de agentes terapéuticos o de diagnóstico, tanto *in vivo* como *in vitro*, a células que expresan PDGF-R $\beta$ , particularmente a células que sobreexpresan PDGF-R $\beta$ . Se proporciona por lo tanto una combinación de un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ . Se proporciona además, en un aspecto relacionado de la invención, una combinación de un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  de acuerdo con la invención y un agente de diagnóstico. Dicha combinación puede usarse en el diagnóstico de una afección relacionada con PDGF-R $\beta$ , por ejemplo en formación de imágenes moleculares de células que sobreexpresan PDGF-R $\beta$ . 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 $\beta$ , 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 $\beta$ , que comprende administrar un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  o dicha combinación con un PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  en un sujeto mamífero, que comprende administrar un polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ " y "afinidad de unión por PDGF-R $\beta$ " 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 $\beta$  puede ensayarse en un experimento en el que PDGF-R $\beta$ , o un fragmento de PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ , 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 $\beta$ . 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 $\beta$  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 $\beta$  o fragmento del mismo puede por ejemplo comprender la secuencia de aminoácidos representada por SEC ID Nº: 540 (domino extracelular de PDGF-R $\beta$ ) o SEC ID Nº: 539 (PDGF-R $\beta$ ). Puede usarse por ejemplo el dominio extracelular de PDGF-R $\beta$  humano recombinante (restos aminoacídicos 1-530, Gronwald y col, 1998, PNAS 85) proporcionado por R&D Systems, Nº 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 $\beta$  comprendidos en polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$  de la invención (SEC ID Nº: 1-179), ejemplos de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$  de 49 restos aminoacídicos de longitud de acuerdo con la invención (SEC ID Nº: 180-358) y ejemplos de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$  de 58 restos aminoacídicos de longitud de acuerdo con la invención (SEC ID Nº: 359-537), así como las secuencias de proteína Z (SEC ID Nº: 538), la entrada de Swiss-Prot P09619 de PDGF-R $\beta$  humano (restos aminoacídicos 1-1106, SEC ID Nº: 539) y la entrada de Swiss-Prot P09619 del dominio extracelular de PDGF-R $\beta$  humano (restos aminoacídicos 33-531 de PDGF-R $\beta$ , SEC ID Nº: 540).

20 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 $\beta$  humano, B) muestra la inyección sobre PDGF-R $\beta$  murino y C) muestra la inyección sobre PDGF-R $\alpha$  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.

25 Las Figuras 3A-D muestran el resultado de un ensayo de epítopos de moléculas variantes Z en PDGF-R $\beta$ . Se inyectaron analitos que contenían diversas concentraciones de moléculas variantes Z y una concentración constante de PDGF-R $\beta$  sobre PDGF-BB inmovilizado. A) Muestra Z01977, B) muestra Z01980, C) muestra Z01982 y D) muestra un control negativo (ZA $\beta$ ). Las concentraciones relativas de PDGF-R $\beta$  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.

30 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 $\beta$  no biotinilado y se realizaron selecciones de pista IIa y IIb frente a PDGF-R $\beta$  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.

35 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 $\beta$  humano, B) muestra la unión a PDGF-R $\beta$  murino y C) muestra la unión a PDGF-R $\alpha$  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.

40 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 $\beta$  humano inmovilizado. Las curvas rectas representan el modelo ajustado.

45 Las Figuras 7A-D muestran imágenes del experimento de inmunofluorescencia descrito en el Ejemplo 5. Las imágenes muestran células AU565 que expresan PDGF-R $\beta$  teñidas con diferentes anticuerpos o variantes Z: A) anticuerpo de cabra anti- PDGF-R $\beta$ , B) His<sub>6</sub>-(Z02465)<sub>2</sub>-Cys, C) His<sub>6</sub>-(Z02483)<sub>2</sub>-Cys y D) His<sub>6</sub>-(Z02516)<sub>2</sub>-Cys.

50 La Figura 8 muestra el resultado del experimento de citometría de flujo descrito en el Ejemplo 5. La Figura muestra titulación de His<sub>6</sub>-(Z02465)<sub>2</sub>-Cys (♦), His<sub>6</sub>-(Z02483)<sub>2</sub>-Cys (■) y His<sub>6</sub>-(Z02516)<sub>2</sub>-Cys (▲) conjugados con Alexa Fluor® 647 en células AU565 que expresan PDGF-R $\beta$ . 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-R $\beta$  humano recombinante con una fusión de Fc C terminal y marcador His<sub>6</sub> (R&D Systems, Nº 385-PR/CF)
- PDGF-R $\beta$ -Fc murino (R&D Systems, Nº 1042-PR/CF)
- PDGF-sR $\alpha$  humano (R&D Systems, Nº 322-PR/CF)
- PDGF-BB (R&D Systems Nº 220-BB/CF)

Ejemplo 1: Selección y exploración de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$ 10 *Materiales y procedimientos*

**Biotinilación de proteína diana:** El domino extracelular de PDGF-R $\beta$  humano recombinante se biotiniló con un exceso molar 10x de Sulfo-NHS-LC-Biotina EZ-link (Pierce Nº 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 Nº 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, Nº 10.0623.02.0005), es decir proteína Z (SEC ID Nº: 538) como se describe en Nilsson y col, Prot Eng 1: 107-113, 1987, con perlas magnéticas revestidas de estreptavidina (Estreptavidina Dynabeads® M-280, Dynal Nº 112.06). Se añadieron 15  $\mu$ g de (Z00000)<sub>2</sub>-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 políclonal (Jackson Immuno Research Nº 009-000-008) por incubación de extremo sobre extremo durante 1 hora a TA usando 4  $\mu$ g 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.

25 **Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$ :** 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-R $\beta$ . 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-R $\beta$  no biotinilado y las pistas IIa y IIb frente a PDGF-R $\beta$  biotinilado. Se muestra una visión de conjunto de la estrategia de selección en la Figura 4A.

35 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.

40 En el ciclo 1 de la selección, el sobrenadante resultante de la preselección se mezcló con PDGF-R $\beta$  100 nM (pista I) o PDGF-R $\beta$  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  $\mu$ l de PBS-T 0,1. Después del lavado, los fagos unidos se eluyeron con 500  $\mu$ l de glicina-HCl 0,1 M, pH 2,2 seguido de neutralización inmediata con 50  $\mu$ l de Tris-HCl, pH 8,0 y 450  $\mu$ l 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.

50 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-R $\beta$  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-R $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\Delta$ M15 de fase logarítmica con 950  $\mu$ 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 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  $\mu$ 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 Nº NO315S) durante 30 minutos a 37 °C. Las células se sedimentaron por centrifugación, se resuspendieron en medio TSB-YE complementado con IPTG 100  $\mu$ M (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido 1 M), kanamicina 25  $\mu$ g/ml y ampicilina 100  $\mu$ 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.

25 30 Exploración de ELISA de variantes Z: Para ensayar si las moléculas variantes Z podían de hecho interaccionar con el PDGF-R $\beta$ , 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  $\mu$ g/ml e IPTG 0,1 mM en placas de pocillos profundos (Nunc Nº 278752). Las placas se incubaron durante 18-24 horas a 37 °C. Después de 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  $\mu$ 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 variantes Z individuales.

40 45 50 55 60 Se revistió media área de placas de ELISA de 96 pocillos (Costar Nº 3690) con 50  $\mu$ l/pocillo de tampón de revestimiento (carbonato sódico 50 mM, pH 9,6) que contenía albúmina de suero humano 6  $\mu$ g/ml (HSA, Sigma Nº A3782) y se incubó durante una noche. La solución de HSA se retiró por vertido y los pocillos se bloquearon con 100  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ l de una mezcla que contenía PDGF-R $\beta$  tanto biotinilado como no biotinilado a una concentración de 4,5  $\mu$ g/ml en PBS-T 0,1 a cada pocillo. Las placas se incubaron durante 1,5 horas a TA seguido de lavado 4x en PBS-T 0,05. Las placas de control de IgG-Fc se prepararon por adición de Fc 3  $\mu$ g/ml de IgG humana en 50  $\mu$ 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, Nº 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  $\mu$ l de sustrato de TMB ImmunoPure (Pierce Nº 34021) a los pocillos y las placas se trataron de 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).

65 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-tatgttggtg) y AFFI-22 (5'-cggaaccagagccaccacgg). La

secuenciación de fragmentos amplificados se realizó usando el oligonucleótido biotinilado AFFI-72 (5'-biotina-cgaaaccagagccaccacccg) 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 5 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 diméricas 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.

10 Los fragmentos génicos hibridados se subclonaron en el vector pAY01448, proporcionando un marcador His<sub>6</sub> N terminal (His<sub>6</sub>-Z#####) y en el vector pAY01449, proporcionando un marcador His<sub>6</sub> N terminal y una cisteína C terminal (His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-Cys). Las variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  se subclonaron como monómeros en pAY01448 y como dímeros en pAY01449 y las construcciones codificadas por los vectores de expresión fueron 15 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* TOP10 electrocompetentes. Las células transformadas se extendieron sobre placas TBAB (base de agar sangre de triptosa 30 g/l) complementadas con kanamicina 50  $\mu$ g/ml, seguido de incubación a 37 °C durante una noche. Las colonias se exploraron usando PCR y 20 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).

25 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 diméricas).

#### Resultados

30 Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$ : Se realizaron cuatro ciclos de selecciones de presentación de fagos frente a PDGF-R $\beta$  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 Ia) diana no biotinilada, alta concentración de diana, Ib) 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 35 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.

40 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 $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  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 45 total, se ejecutaron 147 clones positivos para PDGF-R $\beta$ . 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 aminoacídicos de largo se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N°: 359-369. Los motivos de unión a PDGF-R $\beta$  deducidos de estas variantes Z se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID N°: 1-11. Las secuencias de aminoácidos de los péptidos de 49 restos aminoacídicos 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°: 180-190.

55 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 $\beta$ .

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, 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*

**5** 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.

**10** Las variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  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).

**15** 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.

**20** Caracterización de proteínas: La concentración de las variantes Z purificadas (en forma His<sub>6</sub>-Z##### y en forma His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-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).

**25** 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 (T<sub>m</sub>). 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.

**30** Análisis de unión de Biacore: Las interacciones de ocho variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  monoméricas marcadas con His<sub>6</sub> con PDGF-R $\beta$  humano, PDGF-R $\beta$ -Fc murino y PDGF-sR $\alpha$  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  $\mu$ M se inyectaron en orden aleatorio por duplicado a un caudal de 10  $\mu$ 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.

**35** Ensayo de epítopos: La interacción del receptor PDGF-R $\beta$  con su ligando natural PDGF-BB en presencia de tres variantes Z diferentes (Z01977, Z01980 y Z01982 en forma His<sub>6</sub>-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 $\beta$  100 nM mezclado con diversas concentraciones de variantes Z marcadas con His<sub>6</sub> monoméricas por dilución en el tampón de ejecución HBS-EP. Se usó una variante Z específica para una proteína irrelevante (péptido  $\beta$  amiloide, A $\beta$ ) como un control negativo. Los analitos se inyectaron a un caudal de 10  $\mu$ 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.

**40** Análisis de transferencia puntual: Se ensayaron siete variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  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 antitrombina (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, polyclonal (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 $\alpha$  humano (R&D Systems, N° 322-PR/CF), Albúmina de Suero humano (HSA, Sigma, N° A3782), PDGF-R $\beta$ -Fc murino (R&D Systems, N° 1042-PR/CF), neutravidina (Pierce, N° 31000), estreptavidina (Pierce, N° 21122), transtiretina (Sigma, N° P1742), y PDGF-R $\beta$ -Fc humano. Se aplicaron puntualmente en membranas de nitrocelulosa (Invitrogen) 1  $\mu$ 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

**45** TA. Después de la retirada de la solución, las membranas se incubaron durante 1 hora con 2  $\mu$ g/ml de diferentes variantes Z diméricas, con marcadores His<sub>6</sub> 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 polyclonal contra un epítopo común para todas las variantes Z (Affibody AB, N° 20.1000.01.0005). Esta IgG de cabra anti Z, se diluyó a 1  $\mu$ 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 Nº 34075). Se fotografiaron emisiones de luz con un Chemilimager 5500 (Alpha Innotech Corp.).

### Resultados

5 Producción de proteína: Las moléculas variantes Z tanto monoméricas (en forma His<sub>6</sub>-Z#####) como diméricas (en forma His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-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 Ánálisis 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 (Tm) (Tabla 1).

Tabla 1. Temperaturas de fusión para varias variantes Z

Variante Z	Tm (°C)
His <sub>6</sub> -Z01977	30
His <sub>6</sub> -Z01978	43
His <sub>6</sub> -Z01980	35
His <sub>6</sub> -Z01981	37
His <sub>6</sub> -Z01982	37
His <sub>6</sub> -Z01983	37
His <sub>6</sub> -Z01994	30
His <sub>6</sub> -Z01995	36
His <sub>6</sub> -(Z01976) <sub>2</sub> -Cys	34
His <sub>6</sub> -(Z01977) <sub>2</sub> -Cys	35
His <sub>6</sub> -(Z01980) <sub>2</sub> -Cys	35
His <sub>6</sub> -(Z01982) <sub>2</sub> -Cys	41
His <sub>6</sub> -(Z01983) <sub>2</sub> -Cys	38
His <sub>6</sub> -(Z01994) <sub>2</sub> -Cys	31
His <sub>6</sub> -(Z01995) <sub>2</sub> -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 $\beta$  humano y murino, así como con PDGF-sRa 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 $\beta$  humano (celda de flujo 2): 2240 UR, PDGF-R $\beta$  murino (celda de flujo 3): 2010 UR y PDGF-sRa humano (celda de flujo 4): UR 1900. Todas las variantes Z ensayadas mostraron unión como PDGF-R $\beta$  tanto humano como murino, pero no mostraron unión con PDGF-R $\alpha$  humano. El resultado se presenta en la Figura 2. Z01982 y Z01977 mostraron las curvas de disociación más lentas para PDGF-R $\beta$  humano. Z01982 también mostró la curva de disociación más lenta para PDGF-R $\beta$  murino.

25 Ensayo de epítopo: Se ensayó la unión de PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ -PDGF-BB parcialmente a una relación molar 1:1 (es decir variante Z 100 nM y PDGF-R $\beta$  100 nM). El resultado se presenta en la Figura 3. Cuando se usó un exceso de diez veces de variante Z

en comparación con PDGF-R $\beta$ , el efecto de bloqueo fue casi completo. Para la variante Z de unión a A $\beta$  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  $\mu$ 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 $\beta$  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.

En resumen, se mostró unión a PDGF-R $\beta$  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 $\alpha$  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 $\beta$ . Se mostró que tres de los agentes de unión (Z01977, Z01980 y Z01982) bloqueaban la unión del receptor PDGF-R $\beta$  con su ligando natural PDGF-BB en un ensayo de Biacore. El resultado sugiere que los tres agentes de unión comparten un epítopo 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 $\beta$

En este Ejemplo, se construyó una biblioteca madura. La biblioteca se usó para selecciones de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$ . 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*

Diseño de biblioteca: La biblioteca se basó en las secuencias de las variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  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 Nº: 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
Ala (A)	0	0	6,25	100	6,25	25	17	0	6,25	0	0	0
Arg (R)	50	17	9,375	0	9,375	0	8,25	100	9,375	45	0	37,5
Asn (N)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	100	12,5
Asp (D)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	0	0
Cys(C)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Gln (Q)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Glu (E)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	0	0	12,5
Gly (G)	0	16,5	6,25	0	6,25	0	16,5	0	6,25	0	0	0
His (H)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	16,5
Ile (I)	0	16,5	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Leu (L)	50	17	9,375	0	9,375	0	0	0	9,375	0	0	12,5
Lys (K)	0	0	3,125	0	3,125	12,5	8,25	0	3,125	5	0	12,5
Met (M)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Phe (F)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Pro (P)	0	0	6,25	0	6,25	0	0	0	6,25	0	0	0
Ser (S)	0	16,5	9,375	0	9,375	0	8,25	0	9,375	0	0	12,5
Thr (T)	0	0	6,25	0	6,25	25	17	0	6,25	0	0	0
Trp (W)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	45	0	0
Tyr (Y)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	0	0	0
Val (V)	0	16,5	6,25	0	6,25	0	0	0	6,25	0	0	16,5
Parada ámbar (q)	0	0	3,125	0	3,125	0	0	0	3,125	5	0	0
Parada (.)	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

Construcción de bibliotecas: El oligonucleótido degenerado AFFI-1011 (5'-ctcgaggtagacaacaaattcaacaagaackk-vkynnkcgcgctnnkagatcrmmrvsttacctaactaaaccgtnnkc aawrgaacgccttcatcmrwagttavktgatgacccaagccaaagc) se amplificó por PCR usando 100 fmol de AFFI-1011, 50 pmol de cebador directo AFFI-47 (5'-ccccccccccctcgaggtagacaacaaattcaa) y 50 pmol de cebador inverso AFFI-50 (5'-ccccctgcttagaagttagcgcttggctgggtcatc). 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 Nº 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 PCR 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 *Xba*I y *Nhe*I (New England Biolabs, Nº R0146L, Nº 0131M). La mezcla de reacción de 1500 ml 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 Nº 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 %, MgCl<sub>2</sub> 50 µM, MgSO<sub>4</sub> 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 H<sub>2</sub>O 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-R $\beta$  con propiedades de unión verificadas (Ejemplos 1 y 2). El tamaño teórico de la biblioteca diseñada fue de  $7,5 \times 10^8$  variantes Z. El tamaño real de la biblioteca, determinado por valoración y después de transformación en células *E. coli*. RRIΔM15, fue de  $5,3 \times 10^9$  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 $\beta$ .

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

*Materiales y procedimientos*

5 La proteína diana, PDGF-R $\beta$  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 $\beta$ : Se realizaron selecciones de presentación de fagos contra PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  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, 1b 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  $\mu$ 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  $\mu$ l de PBS y 50  $\mu$ l de Tris-HCl 1 M, pH 8.

20 25 Amplificación de partículas de fago: Después de cada ciclo de selección, se usaron aproximadamente 950  $\mu$ l de los fagos eluidos de las diferentes pistas de selección para infectar células *E. coli* RR1 $\Delta$ 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.

30 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/ml, ampicilina 100  $\mu$ g/ml e IPTG 100  $\mu$ 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.

40 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  $\mu$ 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 $\beta$  humano, a una concentración de 4,5  $\mu$ g/ml en 50  $\mu$ 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.

50 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 $\beta$  marcadas con ABD, previamente preparadas para ELISA, en un instrumento de Biacore (GE Healthcare). Se inmovilizaron PDGF-R $\beta$  humana y HSA en una microplaca CM5 de Biacore; PDGF-R $\beta$  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 seclarificaron 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

### 30 Resultados

Selección de presentación de fagos de polipéptidos de unión a PDGF-R $\beta$ : 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 no 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 $\beta$  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 pAff1/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 Nº: 370-532. Los motivos de unión a PDGF-R $\beta$  de estas variantes Z deducidos se enumeran en la Figura 1 y en la lista de secuencias como SEC ID Nº: 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 Nº: 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 $\beta$  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

5 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 $\beta$  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 10 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 $\beta$  fueron similares. Sin embargo, 15 se vieron pequeñas disimilitudes y relacionando los niveles de expresión de molécula variante Z con los sensogramas de la superficie de PDGF-R $\beta$ , 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 $\beta$  con las 20 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 $\beta$ , 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 $\beta$

##### *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.

30 Se purificaron los monómeros y dímeros constituyentes de las variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  de Z02465, Z02477, Z02483, Z0516 y Z02558 (en forma de His<sub>6</sub>-Z#####-Cys y en forma de His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-Cys; es decir expresados como las construcciones MGSSHHHHH-LQ-[Z#####]-VDC y MGSSHHHHHLQ-[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.

35 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 40 250-195 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 Nº 23030) y con marcadores His<sub>6</sub> (His<sub>6</sub>-Z#####-Cys-NEM), a estudios 45 de interacción en un instrumento Biacore (GE Healthcare) con PDGF-R $\beta$  humano, PDGF-R $\beta$  murino y PDGF-R $\alpha$  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  $\mu$ l/minuto durante 3 minutos. Después de 3 minutos de disociación, las superficies se regeneraron con una inyección de HCl 10 mM.

50 Las afinidades de unión de variantes Z Z02465 y Z02483 (en forma His<sub>6</sub>-Z#####-Cys-NEM) y el agente de unión de primera generación Z01982 (en forma His<sub>6</sub>-Z#####) para PDGF-R $\beta$  humano y murino se determinaron en Biacore. Se inmovilizó PDGF-R $\beta$  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  $\mu$ 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 $\beta$  con respecto a especificidad por análisis de transferencia puntual realizado como se describe en el Ejemplo 2 usando moléculas variantes Z diméricas con marcadores His<sub>6</sub> N terminales y cisteínas C terminales.

Citometría de flujo: Se añadieron cinco moléculas variantes Z diméricas diferentes ( $20$  ó  $5$   $\mu$ g/ml en PBS) a  $0,5 \times 10^6$  células AU565 que expresan PDGF-R $\beta$  (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 Nº A20347,  $5$   $\mu$ 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 $\beta$  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 His<sub>6</sub>-(Z02465)<sub>2</sub>-Cys, His<sub>6</sub>-(Z02483)<sub>2</sub>-Cys y His<sub>6</sub>-(Z02516)<sub>2</sub>-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.

Inmunofluorescencia: Se dejaron crecer durante una noche células AU565 en portaobjetos multipicillo (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 ( $10$   $\mu$ g/ml) o un anticuerpo de cabra anti-PDGF-R $\beta$  ( $5$   $\mu$ 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 ( $5$   $\mu$ g/ml), seguido de Alexa488 anti-IgG de cabra ( $5$   $\mu$ g/ml, Invitrogen Nº A21467). El anticuerpo anti- PDGF-R $\beta$  de cabra se detectó por Alexa488 anti-IgG de cabra. Después de cada adición de anticuerpo, los picillos 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 picillos se secaron y los portaobjetos de vidrio se montaron con solución antidecoloración (medio de montaje Vectashield para fluorescencia con DAPI, Vector Laboratories Nº 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

Expresión y purificación de proteínas: Todas las variantes expresadas, Z02465, Z02477, Z02483, Z02516 y Z02558 (en forma His<sub>6</sub>-Z#####-Cys y en forma His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-Cys) proporcionaron buenos rendimientos de producto genético 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.

Ánalisis 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 <sub>6</sub> -Z02465-Cys	46
His <sub>6</sub> -Z02477-Cys	46
His <sub>6</sub> -Z02483-Cys	44
His <sub>6</sub> -Z02516-Cys	42
His <sub>6</sub> -Z02558-Cys	39
His <sub>6</sub> -(Z02477) <sub>2</sub> -Cys	46

Análisis cinético y de unión de Biacore: La unión de cinco moléculas variantes Z (en forma His<sub>6</sub>-Z##### Cys-NEM) con PDGF-R $\beta$  humano y murino así como con PDGF-R $\alpha$  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 His<sub>6</sub>-Z#####). Todas las variantes Z ensayadas mostraron unión a PDGF-R $\beta$  tanto humano como murino pero no mostraron unión a PDGF-R $\alpha$  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<sub>D</sub>. 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 $\beta$  humano y murino. Las clasificaciones de inmovilización de ligando en las superficies fueron: celda de flujo 2 (h PDGF-R $\beta$ ): 1110 UR, celda de flujo 3 (h PDGF-R $\beta$ ): UR 3010 y celda de flujo 4 (mPDGF-R $\beta$ ): 3080 UR.

Los cálculos de K<sub>D</sub> 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 $\beta$  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.

20 Tabla 4. Constantes de disociación (K<sub>D</sub>) para variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$

Variante Z	PDGF-R $\beta$ humano	PDGF-R $\beta$ murino
His <sub>6</sub> -Z01982	4 nM	27 nM
His <sub>6</sub> -Z02465-Cys-NEM	500 pM	7 nM
His <sub>6</sub> -Z02483-Cys-NEM	400 pM	6 nM

Análisis de transferencia puntual: Las especificidades de Z02516, Z02483 y Z02465 (en forma His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-Cys) para PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  y PDGF-R $\beta$  humano y de ratón recombinante. Las tres moléculas variantes Z se unieron a PDGF-R $\beta$  humano y de ratón pero no a PDGF-R $\alpha$  o a ninguna de las otras 19 moléculas. Por lo tanto, la especificidad de las variantes Z ensayadas fue satisfactoria (datos no mostrados).

25 Citometría de flujo: La capacidad de unión a células de las moléculas variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$  se analizó usando citometría de flujo. Se tiñeron células AU565 que expresaban PDGF-R $\beta$  con 20  $\mu$ g/ml de Z02465, Z02483, Z02477, Z02516 o Z02558 (en forma de His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-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 $\beta$  como un control. Las cinco moléculas variantes Z proporcionaron desplazamientos de la intensidad de fluorescencia (datos no mostrados).

30 Además, las tres moléculas variantes Z Z02465, Z02483 y Z02516 (en forma de His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-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.

35 Inmunofluorescencia: Se detectó PDGF-R $\beta$ , 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 His<sub>6</sub>-(Z#####)<sub>2</sub>-Cys) o un anticuerpo de cabra anti- PDGF-R $\beta$ . 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 $\beta$  internalizada.

40 En conclusión, se mostró unión a PDGF-R $\beta$  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 $\alpha$ , 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 $\beta$ . En experimentos de citometría de flujo, cinco variantes Z diméricas mostraron unión a células que expresaban PDGF-R $\beta$ . 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 $\beta$ . La variante Z02483 también se unió a otras estructuras, que probablemente eran vesículas internas. Esto sugiere que PDGF-R $\beta$  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 Tm de 46 °C.

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

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 $\beta$ .

*Materiales y procedimientos*

Los motivos de unión a PDGF-R $\beta$  de variantes Z Z02465 (SEC ID Nº: 60) y Z02483 (SEC ID Nº: 78) se mutaron para crear las nuevas variantes Z Z03358 (de Z02465, *PBM* enumerada como SEC ID Nº: 179 y las secuencias de polipéptidos de 49 y 58 restos aminoacídicos de longitud enumeradas como SEC ID Nº: 358 y SEC ID Nº: 537, respectivamente), Z02831, Z02832, Z02833 y Z02834 (los cuatro *PBM* de Z02483; enumerados como SEC ID Nº: 175-178 y las secuencias de los polipéptidos de 49 y 58 restos aminoacídicos de longitud enumerados como SEC ID Nº: 354-357 y SEC ID Nº: 533-536, respectivamente).

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, Nº 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).

Se expresaron proteínas marcadas con His<sub>6</sub>, se liberaron por sonicación y se purificaron esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 2. Se expresaron proteínas y marcador His<sub>6</sub> 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.

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 NH<sub>4</sub>HC<sub>0</sub>3 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.

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.

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  $\mu$ l/min.

*Resultados*

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 (Tm), una estimación de la estabilidad molecular, se determinaron con análisis de CD: Z02831 Tm = 44 °C, Z02832 Tm = 42 °C, Z02833 Tm = 49 °C, Z02834 Tm = 49 °C y Z003358 Tm = 42 °C. Las variantes Z recuperaron su estructura helicoidal después de la VTM, es decir la fusión

era reversible.

Una de las variantes Z mutadas, Z02834, mostró una tasa de disociación más rápida de PDGF-R $\beta$  humano que su molécula parental Z02483. Los otros mutantes de Z02483 (Z02831, Z02832 y Z02833) mostraron unión similar con PDGF-R $\beta$  humano que Z02483. Todas las variantes Z mutadas mostraron mejor unión con PDGF-R $\beta$  humano que con PDGF-R $\beta$  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. Contantes de disociación ( $K_D$ ) para variantes Z de unión a PDGF-R $\beta$

<b>Variante Z</b>	<b>PDGF-R<math>\beta</math> humano</b>	<b>PDGF-R<math>\beta</math> murino</b>
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 $\beta$ ), 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) EX<sub>2</sub>X<sub>3</sub>X<sub>4</sub>AAX<sub>7</sub>EID X<sub>11</sub>LPNLX<sub>16</sub>X<sub>17</sub>X<sub>18</sub>QW NAFIX<sub>25</sub>X<sub>26</sub>LX<sub>28</sub>X<sub>29</sub>,  
en la que, de forma independiente entre sí,

X<sub>2</sub> se selecciona de L, R y I;

X<sub>3</sub> se selecciona de R, I, L, V, K, Q, S, H, y A;

X<sub>4</sub> se selecciona de A, R, N, D, Q, E, H, K, M, S, T, W, F y V;

X<sub>7</sub> se selecciona de A, R, D, Q, E, G, K y S;

X<sub>11</sub> se selecciona de A, R, N, D, E, G, K, S, T y Q;

X<sub>16</sub> se selecciona de N y T;

X<sub>17</sub> se selecciona de R y K;

X<sub>18</sub> se selecciona de A, R, N, D, C, Q, E, G, L, K, M, S, T, W y V;

X<sub>25</sub> se selecciona de K, R, Q, H, S, G y A;

X<sub>26</sub> se selecciona de S y K;

X<sub>28</sub> se selecciona de V, R, I, L y A;

X<sub>29</sub> se selecciona de D y K;

y

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 $\beta$  se une a PDGF-R $\beta$  de modo que el valor de K<sub>D</sub> de la interacción es como máximo 1 x 10<sup>-6</sup> M.

2. Polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  de acuerdo con la reivindicación 1, en el que i) es una secuencia seleccionada de SEC ID N<sup>o</sup>: 1-179.

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

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

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

35 i) K-[PBM]-DPSQSX<sub>a</sub>X<sub>b</sub>LLX<sub>c</sub>EAKKLNDX<sub>d</sub>Q;  
en la que

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

X<sub>a</sub> se selecciona de A y S;

X<sub>b</sub> se selecciona de N y E;

X<sub>c</sub> se selecciona de A y S;

X<sub>d</sub> 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.

45 6. Polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  de acuerdo con la reivindicación 5, en el que i) se selecciona de SEC ID N<sup>o</sup>: 180-358.

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

50 8. Polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en el que la secuencia de aminoácidos comprende una secuencia seleccionada de SEC ID N<sup>o</sup>: 359-537.

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

10. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de acuerdo con cualquier reivindicación precedente.
11. Polipéptido de unión a PDGF-R $\beta$  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 $\beta$  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 $\beta$  o combinación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9 y 12, para tratamiento de una afección relacionada con PDGF-R $\beta$  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 Nº:
PBM01976	ERAEEAAQEQIDQLPNLNRGQWNNAFIASLVD	SEC ID Nº: 1
PBM01977	ERQVAAAEEIDALPNLNRGQWNNAFIASLVD	SEC ID Nº: 2
PBM01978	ELSDAAQEQIDSLPNLNRSQWNNAFIKSLID	SEC ID Nº: 3
PBM01979	ERREAAAEEIDNLPNLNRSQWNNAFIQSLVD	SEC ID Nº: 4
PBM01980	ERREAAKEIDSLPNLNRTQWNNAFIKSLAD	SEC ID Nº: 5
PBM01981	ELRHAASEIDDLPLNLNRRAQWNNAFIKSLRD	SEC ID Nº: 6
PBM01982	ELVRAAQEQIDELPNLNRGQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 7
PBM01983	EIKQAAREIDALPNLNKKQWNNAFIQSLAD	SEC ID Nº: 8
PBM01993	ERHRAAQEQIDQLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 9
PBM01994	EIKFAAGEIDDNLPNLNRKQWNNAFIGSLRD	SEC ID Nº: 10
PBM01995	ERLKAEEEIDALPNLNRKQWNNAFISSLRD	SEC ID Nº: 11
PBM02417	ELRAAAAEEIDSLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 12
PBM02418	ERLEAAEEIDSLPNLNRRAQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 13
PBM02419	ELIKAEEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 14
PBM02420	ERIHAAREIDALPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 15
PBM02421	ELIKAEEEIDGLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 16
PBM02422	ELVEAAREIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 17
PBM02423	ELIKAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 18
PBM02424	ELLAAAAEEIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 19
PBM02425	ELINAAKEIDDLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 20
PBM02426	ELVEAAREIDALPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 21
PBM02427	ELRDAAAAEEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 22
PBM02426	ELSAAAAAREIDNLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 23
PBM02429	ELISAAEEIDDLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 24
PBM02430	ELVDAAREIDELPNLNRVQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 25
PBM02431	ELIEAAREIDALPNLNRQWNNAFIKSLRD	SEC ID Nº: 26
PBM02432	ELVEAAKEIDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 27
PBM02433	ELRQAAKEIDNLPNLNRAQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 28
PBM02434	ELVAAAAREIDSLPNLNRTQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 29

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PBM02435	ELR NAAKEIDSLP NLNRQW/NAF IRLS LVD	SEC ID Nº: 30
PBM02436	ELV QAAAREIDELP NLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 31
PBM02437	ELR EAAAEIDNL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 32
PBM02438	ELIE AAREIDNL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 33
PBM02439	ELINA AAREIDGL PNLNRQW/NAF IRLS LVD	SEC ID Nº: 34
PBM02440	ERIAAAQEIDGL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 35
PBM02441	ELINA AKEIDDL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 36
PBM02442	ERSHAAQ EIDAL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 37
PBM02443	ELIAAAKEIDEL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 38
PBM02444	ERIRAAEEIDGL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 39
PBM02445	ELV QAAAREIDAL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 40
PBM02446	ERRE AAREIDIN PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 41
PBM02447	ELRWAAGEIDDKL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 42
PBM02448	ELSRRAAEIDDR PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 43
PBM02449	ELIE AAREIDEL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 44
PBM02450	ELIAAAKEIDDD PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 45
PBM02451	ERVRAAEIDDSL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 46
PBM02452	ELIDAAAEIDDKL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 47
PBM02453	ELIDA AAEIDDKL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 48
PBM02454	ELIEAAEEIDDR PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 49
PBM02455	ELIE AAREIDEL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 50
PBM02456	ELREAAAEIDDSL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 51
PBM02457	ELVDAAREIDDL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 52
PBM02458	ELREAAAEEIDAL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 53
PBM02459	ELIEAAAEEIDKL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 54
PBM02460	ELREAAAGEIDDR PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 55
PBM02461	ELVRAAAEEIDAL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 56
PBM02462	ERSRAAAEEIDAL PNLNRQW/NAF IKS LVD	SEC ID Nº: 57
PBM02463	ELIRAASEIOKLPNLNRQW/NAF IKS LRD	SEC ID Nº: 58

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC. ID NO
PBM02464	ELIKAAQEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 59
PBM02465	ELIEAAAEDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 60
PBM02466	ELWAAAGEIDKLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 61
PBM02467	ERLAAAEEIDNLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 62
PBM02468	ELRKAAAEIDALPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 63
PBM02469	ELIAAAREIDSPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 64
PBM02470	ERVKAEEIDKLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 65
PBM02471	ELIHAEEEDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 66
PBM02472	ELINAAGEIDKLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 67
PBM02473	ELIEAAAEDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 68
PBM02474	ELIAAAREIDSPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 69
PBM02475	ERVDAAREIDNLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 70
PBM02476	ELRDAAAEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 71
PBM02477	ELIAAAAEDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 72
PBM02478	ELRRAAAEEIDKLPLNLNRQWNNAFIKSLID	SEC ID N°: 73
PBM02479	ELWAAAEEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 74
PBM02480	ELRRAAAKEIDNLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 75
PBM02481	ELVQAAAKEIDNLPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 76
PBM02482	ELIEAAGEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 77
PBM02483	ELVKAAAEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 78
PBM02484	ELREAAAREIDSPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 79
PBM02485	ELLEAAKEIDELPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 80
PBM02486	ELVEAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 81
PBM02487	ELREAAAEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 82
PBM02488	ELVRAAAEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 83
PBM02489	ELRRAAAAEIDSPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 84
PBM02490	ELIKAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 85
PBM02491	ELRDAAAHEIDSPLNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 86
PBM02492	ELREAAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID N°: 87

Figura 1

<b>Polipéptido</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>SEC ID Nº</b>
PBM02493	ELIRAAEIDKLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 88
PBM02494	ELLKAAREIDELPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 89
PBM02495	ELIAAAREIDGLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 90
PBM02496	ELVAAAEEIDGLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 91
PBM02497	ELRDAAREIDALPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 92
PBM02498	ERINAAKEIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 93
PBM02499	ELRQAAAEEIDALPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 94
PBM02500	ELVEAAAEEIDRLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 95
PBM02501	ELREAAAEEIDRLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 96
PBM02502	ELIQAACEIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 97
PBM02503	ERSMAAKEIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 98
PBM02504	ELVAAAAREIDDDLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 99
PBM02505	ELVRAAAEIDRLPNLNRLQQWNNAFIKSLID	SEC ID Nº: 100
PBM02506	ELREAAAEEIDDLPLNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 101
PBM02507	ELVEAAKEIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 102
PBM02508	ELINAAGEIDRLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 103
PBM02509	ELLSAAAEEIDSLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 104
PBM02510	ELRDAAAEIDKLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 105
PBM02511	ELRQAAAEEIDKLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 106
PBM02512	ELREAAAEEIDALPNLNRVQWNNAFIKSLRD	SEC ID Nº: 107
PBM02513	ELVAAAEEIDRLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 108
PBM02514	ELIDAEEIDKLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 109
PBM02515	ERINAAAEEIDGLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 110
PBM02516	ELVRAAAEIDNLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 111
PBM02517	ELIRAAKEIOELPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 112
PBM02518	ELIQAAREIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 113
PBM02519	ELIDAAREIDDLPLNLNRQQWNNAFIKSLLD	SEC ID Nº: 114
PBM02520	ELLKAADEIDALPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 115
PBM02521	ELLEAAAEEIDSLPNLNRQQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 116

**Figura 1**

<b>Polipéptido</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>SEC ID Nº</b>
PBM02522	ELVDAAREIDTLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 117
PBM02523	ELIEAAREIDKLPNPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 118
PBM02524	ELVAAAAREIDNLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 119
PBM02525	ELVIEAAAEEIDGLPNLNRDQWNNAFIKSLRD	SEC ID Nº: 120
PBM02526	ELRNAAAKEIDGLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 121
PBM02527	ELRHAAREIDGLPNLNRTQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 122
PBM02528	ELVVEAAREIDTLPNLNRRQWNNAFIKSLRD	SEC ID Nº: 123
PBM02529	ELVAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 124
PBM02530	ELRTAAKEIDDLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 125
PBM02531	ELLRAAREIDSLSPNLNRTQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 126
PBM02532	ERRAAREIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 127
PBM02533	ELRRAAAEIDRLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 128
PBM02534	ELIEAAAEEIDALPNLNRKQWNNAFISSLVD	SEC ID Nº: 129
PBM02535	ERIEAAREIDELPNLNRKQWNNAFISSLVD	SEC ID Nº: 130
PBM02536	ELIAAAKEIDELPNLNRAQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 131
PBM02537	ELINAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 132
PBM02538	ELVKAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 133
PBM02539	ELIAAAKEIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 134
PBM02540	ELISAAREIDKLPNPNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 135
PBM02541	ELREAAAEEIDKLPNPNLRWQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 136
PBM02542	ELVVEAAREIDGLPNLNRAQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 137
PBM02543	ELVAAAQQEIDNLPNLNRKQWNNAFISSLVD	SEC ID Nº: 138
PBM02544	ELRNAAAAEIDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 139
PBM02545	ELIQAASEIDALPNLNRTQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 140
PBM02546	ELVIEAAAEEIDSLSPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 141
PBM02547	ERIAAAQEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 142
PBM02548	ELRDAAAKEIDSPLNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 143
PBM02549	ELVAAAEEIDKLPNLNRKQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 144
PBM02550	ELIKAAREIDELPNLNRKQWNNAFIKSLUD	SEC ID Nº: 145

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PBM02551	ELVVEAASEIDGLPDLNLRNQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 146
PBM02552	ELLRAAAEIDNLPNLNRAQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 147
PBM02553	ELIKAKEIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 148
PBM02554	ELRRAAAEIDSLPDLNLRQWNNAFIKSLID	SEC ID Nº: 149
PBM02555	ELVVEAAREIDGLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 150
PBM02556	ELVVEAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 151
PBM02557	ELWAAAEEIDRLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 152
PBM02558	ERIRRAAREIDELPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 153
PBM02559	ELRQQAKEIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 154
PBM02560	ELRREAAAEIFDKLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 155
PBM02561	ELRRAAAEIDKLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 156
PBM02562	ELVQAAREIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 157
PBM02563	ELRRAAAEIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 158
PBM02564	ELRRAAAEIDKLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 159
PBM02565	ERIQQAKEIDELPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 160
PBM02566	ELVAAAEEIDKLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 161
PBM02568	ELVRAAAEIDNLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 162
PBM02569	ELRTAAAEEIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 163
PBM02570	ELVVEAAAEIFALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 164
PBM02571	ELIKAEEIDDKLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 165
PBM02572	ELRREAAAEIFDNLPNLNRQWNNAFIKSLID	SEC ID Nº: 166
PBM02573	ELIEAAREIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 167
PBM02574	ELREAAQEQIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 168
PBM02575	ELRSAAEEIDSLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 169
PBM02576	ELVVEAAAEIFDNLPNLNRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 170
PBM02577	ELVVEAAGEIDNLPNLNRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 171
PBM02578	ELSKAAAEEIDALPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 172
PBM02579	ELIWAAGEIDRLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 173
PBM02580	ELRQAAAEIFDGLPDLNLRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 174

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PBM02831	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNNAFIKSLVD	SEC ID Nº: 175
PBM02832	ELVKAAAEIDALPNLNRQQWNNAFIKKLVD	SEC ID Nº: 176
PBM02833	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNNAFIKKLV	SEC ID Nº: 177
PBM02834	ELVKAAAEIDALPNLTRRQWNNAFIKKLVK	SEC ID Nº: 178
PBM03358	ELIEAAAEEIDALPNLTRRQWNNAFIKKLV	SEC ID Nº: 179
PB01976	KERAEEAAQEIIDQLPNIQNRRQWNNAFIASLVDPPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 180
PB01977	KERQVAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIASLVDPPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 181
PB01978	KELSDAAQEIOSLSPNLRNRSQWNNAFIKSLDDPPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 182
PB01979	KERREAAAEEIDNLPNLNRSQWNNAFIQSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 183
PB01980	KERREAAKEIDSLPNIQNRTQWNNAFIKSLADDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 184
PB01981	KELRHAASEIDDLPNLNRAQWNNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 185
PB01982	KELVRAAQEIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 186
PB01983	KEIKQAAREIDALPNLNKQWNNAFIQSLADDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 187
PB01993	KERIHRRAAQEIDQLPNIQNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 188
PB01994	KEIKFAAAGEIDNLPNLNRRKQWNNAFIGSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 189
PB01995	KERIKAAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFISSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 190
PB02417	KELRRAAAAEIDSLPNIKRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 191
PB02418	KERLEAAEEIDSLPNIQNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 192
PB02419	KELIKAAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 193
PB02420	KERIHAAREIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 194
PB02421	KELIKAAAAEEIDGLPNIKRNQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 195
PB02422	KELVEAAREIDS L PNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 196
PB02423	KELIKAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 197
PB02424	KELIAAAEEIDSLPNIQNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 198
PB02425	KELINAAKEIDDLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 199
PB02426	KELVEAAREIDALPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 200
PB02427	KELRDAAAEIDRLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 201
PB02428	KELSAAAAREIDNLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 202
PB02429	KELISAAAEEIDDLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 203

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02430	KELVDAAREIDELPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 204
PB02431	KELIEAAREIDALPNLNRSQWMNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 205
PB02432	KELVEAAKEIDKLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 206
PB02433	KELRQAAKEIDNLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 207
PB02434	KELVAAAREIDSLPNLNRTQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 208
PB02435	KELRNAAKEIDSLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 209
PB02436	KELVQAAREIDELPNLNRTQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 210
PB02437	KELREAAFEIDNLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 211
PB02438	KELIEAAREIDNLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 212
PB02439	KELINAAREIDGLPNLNRMQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 213
PB02440	KERIAAAQEIDGLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 214
PB02441	KELINAAKEIDDLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 215
PB02442	KERSHAQAEIDALPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 216
PB02443	KELIAAAKEIDELPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 217
PB02444	KERIRAAEEIDGLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 218
PB02445	KELVQAAREIDALPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 219
PB02446	KERREAAAREIDNLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 220
PB02447	KELRWAAGEIDKLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 221
PB02448	KELSRAAEIDRLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 222
PB02449	KELIEAAREIDELPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 223
PB02450	KELIAAAKEIDDLPNLNREQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 224
PB02451	KERVRAAEEDSLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 225
PB02452	KELIDAAAEEIDKLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 226
PB02453	KELIDAAAEEIDKLPNLNRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 227
PB02454	KELIEAAAEEIDRLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 228
PB02455	KELIEAAREIDELPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 229
PB02456	KELREAAFFEIDSFLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 230
PB02457	KELVDAAREIDDLPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 231
PB02458	KELREAMEIDALPNLNRRQWMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº. 232

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02459	KELIEAAAEDKLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 233
PB02460	KELREAAGEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 234
PB02461	KELVRAAEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 235
PB02462	KERSRAAAEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 236
PB02463	KELIRAAS EIDKL PNLN RRQWNNAFIKSLRDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 237
PB02464	KELIKAQAEIDRLPNLNRRTQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 238
PB02465	KELIEAAAEDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 239
PB02466	KELIWAAGEIDKLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 240
PB02467	KERLAAAEEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 241
PB02468	KELRKAQAEEDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 242
PB02469	KELIJAAREIDSPLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 243
PB02470	KERVKAQAEEDKLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 244
PB02471	KELIHAEEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 245
PB02472	KELINAAGEIDKLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 246
PB02473	KELIEAAAEDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 247
PB02474	KELIAAAREIDSPLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 248
PB02475	KERVDAAREIDNLPLNLRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 249
PB02476	KELRDAAAEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 250
PB02477	KELIAAAEEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 251
PB02478	KELRAAAEEIDKLPNLNRQWNNAFIKSLDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 252
PB02479	KELIWAQAAEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 253
PB02480	KELRAAAKEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 254
PB02481	KELVQAAKEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 255
PB02482	KELIEAAGEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 256
PB02483	KELVKAQAAEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 257
PB02484	KELREAAREIDS L PNLNRSQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 258
PB02485	KELLEAAKEIDELPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 259
PB02486	KELVEAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 260
PB02487	KELREAAAEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 261

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02488	KELVRAAAEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 262
PB02489	KELRAAAAEDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 263
PB02490	KELRAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 264
PB02491	KELRDAAREIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 265
PB02492	KELRREAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 266
PB02493	KELRAAFFEIDKLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 267
PB02494	KELLKAAREIDELPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 268
PB02495	KELJAAAREIDIGLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 269
PB02496	KELVAAAEEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 270
PB02497	KELRDAAREIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 271
PB02498	KERINAKEAEDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 272
PB02499	KERLQAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 273
PB02500	KELVEAAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 274
PB02501	KELREAAAEEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 275
PB02S02	KELIQAKEAEDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDao	SEC ID Nº 276
PB02503	KERSMAAKEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 277
PB02504	KELVAAAAREIDDIIDPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 278
PB02505	KELVRAAAEEDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 279
PB02S06	KELREAAAEEIDDLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDao	SEC ID Nº 280
PB02507	KELVEAAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 281
PB02508	KELINAAGEIDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 282
PB02509	KELLSAAAEEIDSLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 283
PB02510	KELRDAAAEIDKLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 284
PB02511	KELRQAAAEEIDKLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 285
PB02512	KELREAAAEEIDALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKL1Daq	SEC ID Nº 286
PB02513	KELVAAAEEEDRLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 287
PB02514	KELIDAEEIDKLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 288
PB02515	KERINAEEIDGLPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 289
PB02516	KELVRAAAEEDNLPLNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEKKLNDaq	SEC ID Nº 290

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02517	KELIRAAKEIDELPNLNRRQWNNAFIRSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 291
PB02516	KELIQAAREIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 292
PB02519	KELIDAAREIDDLPLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 293
PB02520	KELIKAADEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 294
PB02521	KELLEAAAEEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 295
PB02522	KELVDAAREIDDTLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 296
PB02523	KELIEAAREIDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 297
PB02524	KELVAAAREIDNLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 298
PB02525	KELVEAAAEEIDGLPLNLNRRDQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 299
PB02526	KELRNAAKEIDGLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 300
PB02527	KELRHAAREIDGLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 301
PB02528	KELVEAAREIDTLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 302
PB02529	KELVAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 303
PB02530	KELRTAAKEIDDLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 304
PB02531	KELRRAAREIDSLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 305
PB02532	KERIRRAAREIDALPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 306
PB02533	KELRRAAAEEIDRLPLNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 307
PB02534	KELIEAAAEEIDALPLNLNRRQWNNAFISSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 308
PB02535	KERIEAAREIDELPNLNRRQWNNAFISSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 309
PB02536	KELLAAAKEIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 310
PB02537	KELINAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 311
PB02538	KELVKAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 312
PB02539	KELIAAAKEIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 313
PB02540	KELISAAREIDDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 314
PB02541	KELREAAAEEIDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 315
PB02542	KELVEAAREIDGLPLNLNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 316
PB02543	KELVAAAQEIDNLPLNLNRRQWNNAFISSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 317
PB02544	KELRNAAAEIDKLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 318
PB02545	KELIQQAASEEIDALPNLNRTQWNNAFIKSLVDDPSQSANSANLLAEAKKLINDAQ	SEC ID Nº: 319

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02546	KELVEAAAEIDSLPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 320
PB02547	KERIAAAQEI DALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 321
PB02548	KELRDAAKEIDSLPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 322
PB02549	KELVAAAKAEIDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 323
PB02550	KELIKAAREIDELPVLNRRQWNAFIKSLDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 324
PB02551	KELVEAASEIDGLPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 325
PB02552	KELLRAAAEIDNLPLVLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 326
PB02553	KELIKAKEIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 327
PB02554	KELRRAAAEIDSLPVLNRDQWNAFIKSLDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 328
PB02555	KELVEAAREIDGLPVLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 329
PB02556	KELVEAAREIDELPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 330
PB02557	KELVWAAAEDRLPVLNRCQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 331
PB02558	KERIKAAREIDELPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 332
PB02559	KELRQAAKEIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 333
PB02560	KELREAAAEDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 334
PB02561	KELRRAAAEIDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 335
PB02562	KELVQAAAREIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 336
PB02563	KELRAAAEEIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 337
PB02564	KELRAAAEEIDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 338
PB02565	KERIQAAKEIDELPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 339
PB02566	KELVAAAEEIDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 340
PB02568	KELVRAAAEIDNLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 341
PB02569	KELRTAAAEEIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 342
PB02570	KELVEAAAEEIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 343
PB02571	KELIKAEEEEIDKLPLVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 344
PB02572	KELREAAAEEIDNLPLVLNRRQWNAFIKSLDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 345
PB02573	KELIEAAREIDALPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 346
PB02574	KELREAAAQEEIDSLPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 347
PB02575	KELRSAAAEEIDSLPVLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 348

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
PB02576	KELVEAAEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 349
PB02577	KELVEAGEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 350
PB02578	KELSKAAAEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 351
PB02579	KELLWAAGEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 352
PB02580	KELRQAAAEIDGLFPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQ	SEC ID Nº: 353
PB02831	KELVKAAAEIDALPNLTRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ	SEC ID Nº: 354
PB02832	KELVKAAAEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ	SEC ID Nº: 355
PB02833	KELVKAAAEIDALPNLTRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ	SEC ID Nº: 356
PB02834	KELVKAAAEIDALPNLTRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ	SEC ID Nº: 357
PB03358	KELIEAAAEIDALPNLTRRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSQ	SEC ID Nº: 358
Z01976	VDNKFNKERAAEIDQLPNLNRQWNNAFIASLVDPPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 359
Z01977	VDNKFNKERQVAEEIDALPNLNRQWNNAFIASLVDPPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 360
Z01978	VDNKFNKELSDAAQEIDSLPNLNRSQWNNAFIKSLIDDPSPQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 361
Z01979	VDNKFNKERREAAEIDNLPNLNRSQWNNAFIQSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 362
Z01980	VDNKFNKERREAAKEIDSLPNLNRQWNNAFIKSLRADDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 363
Z01981	VDNKFNKELRHAASEIDDLPNLNRQWNNAFIKSLRADDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 364
Z01982	VDNKFNKELVRAAQEIDELPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 365
Z01983	VDNKFNKELKGAAREIDALPNLNRQWNNAFIQSLADDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 366
Z01993	VDNKFNKERHAAQEIDQLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 367
Z01994	VDNKFNKKEIKFAAGEIDNLPNLNRQWNNAFIKSLRDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 368
Z01995	VDNKFNKERLKAEEIDALPNLNRQWNNAFISSLRDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 369
Z02417	VDNKFNKELRAAAEIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 370
Z02418	VDNKFNKERLEAAEIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 371
Z02419	VDNKFNKELIKAAAEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 372
Z02420	VDNKFNKERIHAAREIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 373
Z02421	VDNKFNKELIKAAAEIDGLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 374
Z02422	VDNKFNKELVAAARE1DSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 375
Z02423	VDNKFNKELIKAAAREIDELPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 376
Z02424	VDNKFNKELLAAAEEIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEEAKKLNDAQPK	SEC ID Nº: 377

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
Z02425	VDNKFNIKELINA <del>AAKEIDDL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 378
Z02426	VDNKFNIKELVEA <del>AREIDAL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 379
Z02427	VDNKFNIKELR <del>DAAEIDRL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 380
Z02428	VDNKFNIKEL <del>SAAREIDNL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 381
Z02429	VDNKFNIKEL <del>ISAAEIDDL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 382
Z02430	VDNKFNIKELV <del>DAAREIDEL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 383
Z02431	VDNKFNIKEL <del>IAAREIDAL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 384
Z02432	VDNKFNIKELV <del>EAACEIDKL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 385
Z02433	VDNKFNIKELR <del>QAAKEIDNL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 386
Z02434	VDNKFNIKELV <del>AAAREIDSL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 387
Z02435	VDNKFNIKELR <del>NAAKEIDSL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 388
Z02436	VDNKFNIKELV <del>QAAREIDEL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 389
Z02437	VDNKFNIKEL <del>REAAEEDNL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 390
Z02438	VDNKFNIKEL <del>IEAAREIDNL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 391
Z02439	VDNKFNIKEL <del>INAAREIDGL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 392
Z02440	VDNKFNIKEL <del>IAAQEIDGL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 393
Z02441	VDNKFNIKEL <del>INA<del>AAKEIDDL</del></del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 394
Z02442	VDNKFNIKERSH <del>AAQEIDAL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 395
Z02443	VDNKFNIKEL <del>IAAAKEIDEL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 396
Z02444	VDNKFNIKEL <del>IRAAEIDGL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 397
Z02445	VDNKFNIKEL <del>VQAAREIDAL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 398
Z02446	VDNKFNIKER <del>REAAEIDNL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 399
Z02447	VDNKFNIKEL <del>RWAAGE1DKL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 400
Z02448	VDNKFNIKEL <del>SRAAEEDRL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 401
Z02449	VDNKFNIKEL <del>IEAAREIDEL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 402
Z02450	VDNKFNIKEL <del>IAAAKEIDDL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 403
Z02451	VDNKFNIKERV <del>RAAEEDSL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 404
Z02452	VDNKFNIKEL <del>UAAA1DKL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 405
Z02453	VDNKFNIKEL <del>UAAA1DKL</del> PNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 406

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
Z02454	VDNKFNKEL[EAAEIDRLPNLNRQQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 407
Z02455	VDNKFNKEL[EAAAREIDELPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 408
Z02456	VDNKFNKEL[REAAEIDSLPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 409
Z02457	VDNKFNKEL[VDAAREIDLDPNLNRGQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 410
Z02458	VDNKFNKEL[REAAAIDLDPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 411
Z02459	VDNKFNKEL[EAAAEIDLKPNLNRAQMNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 412
Z02460	VDNKFNKEL[REAAEIDLRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 413
Z02461	VDNKFNKEL[VRAAEEIDLALPDLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 414
Z02462	VDNKFNKERSRAAAEIDLALPDLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 415
Z02463	VDNKFNKEL[RAASEIDLKPNLNRRQWNNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 416
Z02464	VDNKFNKEL[KAQAEIDLRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 417
Z02465	VDNKFNKEL[EAAEIDLALPDLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 418
Z02466	VDNKFNKEL[WAAGEIDLKPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 419
Z02467	VDNKFNKEL[AAAEEIDLDPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 420
Z02468	VDNKFNKEL[KAAEEIDLALPDLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 421
Z02469	VDNKFNKEL[AAAREIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 422
Z02470	VDNKFNKEL[VKAAEEIDLKPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 423
Z02471	VDNKFNKEL[HAEEIDLRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 424
Z02472	VDNKFNKEL[INAAGEIDLKPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 425
Z02473	VDNKFNKEL[EAAAEIDLALPDLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 426
Z02474	VDNKFNKEL[AAAAREIDSLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 427
Z02475	VDNKFNKEL[VDAAREIDLNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 428
Z02476	VDNKFNKEL[RDAAEIDLRLPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 429
Z02477	VDNKFNKEL[AAAEEIDLRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 430
Z02478	VDNKFNKEL[RAAAEEIDLKPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 431
Z02479	VDNKFNKEL[WAEEIDLRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 432
Z02480	VDNKFNKEL[RAAAEIDLNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 433
Z02481	VDNKFNKEL[VQAAEIDLNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 434
Z02482	VDNKFNKEL[EAAAEIDLALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 435

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº
Z02483	VDNKFNKELVKAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 436
Z02484	VDNKFNKELREAAEIDSLPNLNRSQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 437
Z02485	VDNKFNKELLEAAKEIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 438
Z02486	VDNKFNKELVIAEEIDELPNLNRSQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 439
Z02487	VDNKFNKELREAAAEIDALPNLNRSQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 440
Z02488	VDNKFNKELVRAAEEIDRLPNLNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 441
Z02489	VDNKFNKELRRAAEEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 442
Z02490	VDNKFNKELIRRAAREIDELPNLNRMQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 443
Z02491	VDNKFNKELRDAAREIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 444
Z02492	VDNKFNKELREAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 445
Z02493	VDNKFNKELRRAAEEIDKLPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 446
Z02494	VDNKFNKELKAAREIDELPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 447
Z02495	VDNKFNKELIAAAREIDGLPNLNRKQWNNAFIKSLVDDPSQSATMLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 448
Z02496	VDNKFNKELVAAAEEIDGLPNLNRKQWNNAFIHSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 449
Z02497	VDNKFNKELRDAAREIDALPNLNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 450
Z02498	VDNKFNKERINAKEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 451
Z02499	VDNKFNKELRQAAAEEIDALPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 452
Z02500	VDNKFNKELVAAAEEIDRLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 453
Z02501	VDNKFNKELREAAAEEIDRLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 454
Z02502	VDNKFNKELQAAAEEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 455
Z02503	VONKFNKERSMAAEKEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 456
Z02504	VDNKFNKELVAAAAREIDDLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 457
Z02505	VDNKFNKELVRAAEEIDRLPNLNRLQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 458
Z02506	VDNKFNKELREAAAEEIDDLPNLNRAQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 459
Z02507	VDNKFNKELVAAAEEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 460
Z02508	VDNKFNKELINAAGEIDRLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 461
Z02509	VDNKEWELLSAAAEEIDSLPNLNRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 462
Z02510	VDNKFNKELRDAAAEIDKLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 463
Z02511	VDNKFNKELRQAAAEEIDKLPNLNRQWNNAFIQSLVDDPSQSANILLAEAKKLNDQAPK	SEC ID Nº: 464

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC	ID	Nº
Z02512	VDNKFMELPXAAAEDALPNLNRVQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 465
Z02513	VDNKFNKELVAAAEEDRLPNLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 466
Z02514	VDNKFNKELIDAAAEDKLPLNLRNQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 467
Z02515	VDNKFNKELINAAAEDGGLPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 468
Z02516	VDNKFKKELVRAAEEIDNLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 469
Z02517	VDNKFNKELPAAKEIDELPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 470
Z02518	VDNKFNKELIQAAREIDSLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 471
Z02519	VDNKFNKELIDAAAREIDDLPLNLRQWNAFIKSLLDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 472
Z02520	VDNKFNKELIKAADEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 473
Z02521	VDNKFNKELLEAAAEDSLPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 474
Z02522	VDNKFNKELVDAAREIDTLPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 475
Z02523	VDNKFNKELIEAAREIDKLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 476
Z02524	VDNKFNKELVAAAREIDNLPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 477
Z02525	VDNKFNKELVEAAAEDGGLPNLNRRQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 478
Z02526	VDNKFNKELRNAAAKEIDGLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 479
Z02527	VDNKFNKELRHAAREIDGLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 480
Z02528	VDNKFNKELVEAAREIDTLPLNLRRQWNAFIKSLRDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 481
Z02529	VDNKFNKELVAAAEEIDALPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 482
Z02530	VDNKFNKELRTAAKEIDDLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 483
Z02531	VDNKFNKELLRAAREIDSLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 484
Z02532	VDNKFNKELIRRAAREIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 485
Z02533	VDNKFNKELRAAAEEIDRLPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 486
Z02534	VDNKFNKELIEAAAEDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 487
Z02535	VDNKFNKERIEAAREIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 488
Z02536	VDNKFNKELLAAAKEIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 489
Z02537	VDN'YFNKELINAAREIDELPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 490
Z02538	VDNKFNKELVAAAEEIDALPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 491
Z02539	VDNKFNKELIAAAKEIDELPLNLRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 492
Z02540	VDNKFNKELISAAREIDKLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC	ID	Nº: 493

Figura 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID	Nº
Z02541	VDNKFINKELREAAEEDKLPNLRQWQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 494	
Z02542	VDNKFINKELVEAAREIDGLPDLNRAQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 495	
Z02543	VDNKFINKELVAAAQEIDNLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 496	
Z02544	VDNKFINKELRNAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 497	
Z02545	VDNKFINKELQAAEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 498	
Z02546	VDNKFINKELVEAAAEEIDSLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 499	
Z02547	VDNKFINKERIAAAQEIIDLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 500	
Z02548	VDNKFINKELRDAAKEIDSLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 501	
Z02549	VDNKFINKELVAAKEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 502	
Z02550	VDNKFINKELIKAAREIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 503	
Z02551	VDNKFINKELVEAASEIDGLPDLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 504	
Z02552	VDNKFINKELLRAAEEIDNLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 505	
Z02553	VDNKFINKELVAAAEEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 506	
Z02554	VDNKFINKELRRAAAEIDSLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 507	
Z02555	VDNKFINKELVEAAREIDGLPDLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 508	
Z02556	VDNKFINKELVEAAREIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 509	
Z02557	VDNKFINKELVAAAEEIDRPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNOAQPK	SEC ID N°: 510	
Z02558	VDNKFINKERIARAAREIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 511	
Z02559	VDNKFINKELRQAAKEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 512	
Z02560	VDNKFINKELREAAEEDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 513	
Z02561	VONKFINKELRRAAAEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 514	
Z02562	VDNKFINKELVQAAREIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 515	
Z02563	VDNKFINKELRAAAEEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 516	
Z02564	VDNKFINKELRAAAEEIDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 517	
Z02555	VDNKFINKERQAAKEIDELPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 518	
Z02566	VDNKFINKELVAAAEEEDKLPNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 519	
Z02568	VDNKFINKELVRAAAEEDNLPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 520	
Z02569	VDNKFINKELRTAAAEEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 521	
Z02570	VDNKFINKELVEAAAEEIDALPLNLRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDDAQPK	SEC ID N°: 522	

Figura 1

<b>Polipéptido</b>	<b>Secuencia de aminoácidos</b>	<b>SEC ID Nº</b>
Z02571	VDNKFNIKELIKAAEEDKLPNLNRQWMQWNNAFIRSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 523
Z02572	VDNKFNIKELREAAAEDNLPLNLRRQWNNAFIKSLDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 524
Z02573	VDNKFWEELIAAREEDALPNLNRKQWNNAFIRSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 525
Z02574	VDNKFNIKELREAAEIDSLPLNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 526
Z02575	VDNKFNIKELRSAAEEDSLPLNLRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 527
Z02576	VDNKFNIKELVEAAAEEIONLPLNLRRMQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 528
Z02577	VDNKFNIKELVEAAAEEIDNLPLNLRRQWNNAFIRSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 529
Z02578	VDNKFNIKELSKAEEIDALPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 530
Z02579	VDNKFNIKELLWAAGEIDRLPNLNRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 531
Z02580	VDNKFNIKELRQAAAEDGLPLNLRRQWNNAFIKSLVDDPSQSANSLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 532
Z02831	VDAKFAKELYKAAAEEIDALPNLTRRQWNNAFIKSLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSSQAPK	SEC ID Nº: 533
Z02832	VDAKFAKELYKAAAEEIDALPNLNRQWNNAFIKKLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSSQAPK	SEC ID Nº: 534
Z02833	VDAKFAKELYKAAAEEIDALPNLTRRQWNNAFIKKLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSSQAPK	SEC ID Nº: 535
Z02834	VDAKFAKELYKAAAEEIDALPNLTRRQWNNAFIKKLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSSQAPK	SEC ID Nº: 536
Z03358	AEAKYAKELEAAAEDALPNLTRRQWNNAFIKKLVDDPSQSSELLSEAKKLNDSSQAPS	SEC ID Nº: 537
Z00000	VDNKFNIKEQQ NAFYEILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKKLNDAAQAPK	SEC ID Nº: 538

**Figura 1**

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID Nº:
PDGF-R $\beta$	MRLPGAMPAL ALKGELLLLS LLLLEPQIS QGLVVTPPGP ELVNVSSTF VLTCGSAPP VWERMSEQEPP QEMAKAQDG FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV PDPTVGFLPN DAEELFLFLT EITEITIPCR VTDPQLVNTL HEKKGDVALP VPYDHQRGFS GIFEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYYVYRLQ VSSINVSNA VOTVVRQGEN ITLMCIVIGN EVNNFEWTYP RKESGRLVEP VTDFLLDMPY HIRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH QDEKAINTTV VESGYVRLLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLM FKDNRTLGDS SAGETALSTR NVSETTRYVE LTlVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFO LQINVPVRVL ELSESHPDSG EQTVRCRGRG MPQPNITWSA CRDLKRCPRE LPPTLGNSS EEESQLETNV TYWEEEQEEF VVSTLRLQHV DRPLSVRCCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF KVUVVISAILA IAVVLTISLI IILIMWQKWP RYEIRWKVIE SVSSDGHEYI YVDPMQLPYD STWELPRDQL VLGRTLGSGA FGQVVVEATAH GLSHSQATMK VAKMILKSTA RSSEKQALMS EJKIMSHLGP HLNVNVNLGA CTKGGPIYII TEYCRYGDV DYLHRNKHTF LQHHSDKRRP PSAELYSNAL EVGLPLPSHV SLTGESDGGY MDMSKDESVD YVPMILDMKGD VKYADIESSN YMAYPONYVP SAPERTCRAT LINESPVLSY MDLVGFSYQV ANGMEFLASK NCVHRDLAAR NVLICEGKLV KICDFGLARD IMRDNSYISK GSTFLPLKWW APESTIFNSLY TTLSDWWSFG IILWEIFTLG GTPYPELPMN EQYNAIKRG YRMAQOPAHAS DEIYEIMQKC WEEKFEIRPP FSQVLLER LJGEGYKKKY QQVDEEFLRS DHPAILRSQA RLPGFHGLRS PLDTSSVLYT AVQPNEGND YIIPLPDPKP EVADEGPLEG SPSLASSTLN EVNTSSTISIC DSPLEPQDEP EPEFQLEQV EPEPELEQQLP DSGCPAPRAE AEDSFL	SEC ID Nº: 539
PDGF-R $\beta$ EC	VVTTPGP ELVNVSSTF VLTCGSAPP VVERMSQEPP OEMAKAQDG FSSVLTLTNL TGLDTGEYFC THNDSRGLET DERKRLYIFV PDPTVGFLPN DAEELFLFLT EITEITIPCR VTDPQLVNTL HEKKGDVALP VPYDHQRGFS GIFIEDRSYIC KTTIGDREVD SDAYYVYRLQ VSSINVSNA VOTVVRQGEN ITLMCIVIGN EVNNFEWTYP RKESGRLVEP VTDFLLDMPY HIRSILHIPS AELEDSGTYT CNVTESVNDH QDEKAINTTV VESGYVRLLG EVGTLQFAEL HRSRTLQVVF EAYPPPTVLM FKDNRTLGDS SAGEIALSTR NVSETTRYVE LTlVRVKVAE AGHYTMRAFH EDAEVQLSFO LQINVPVRVL EJSESHPDSG EQTVRCRGRG MPQPNIWSA CRDLKRCPRE LPPTLGNSS EEESQLETNV TYWEEEQEEF VVSTLRLQHV DRPLSVRCCTL RNAVGQDTQE VIVVPHSLPF K	SEC ID Nº: 540

Figura 1

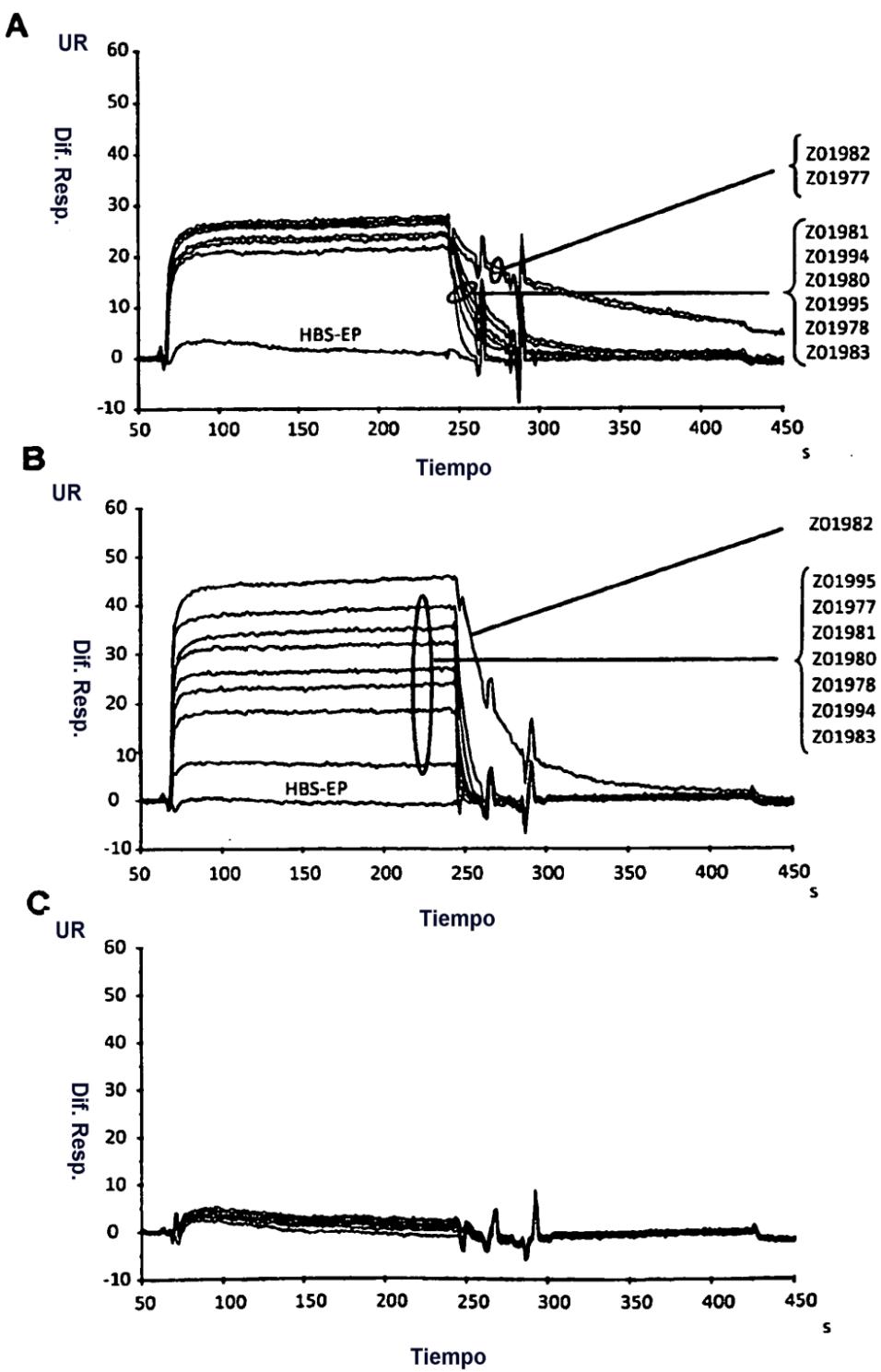


Figura 2

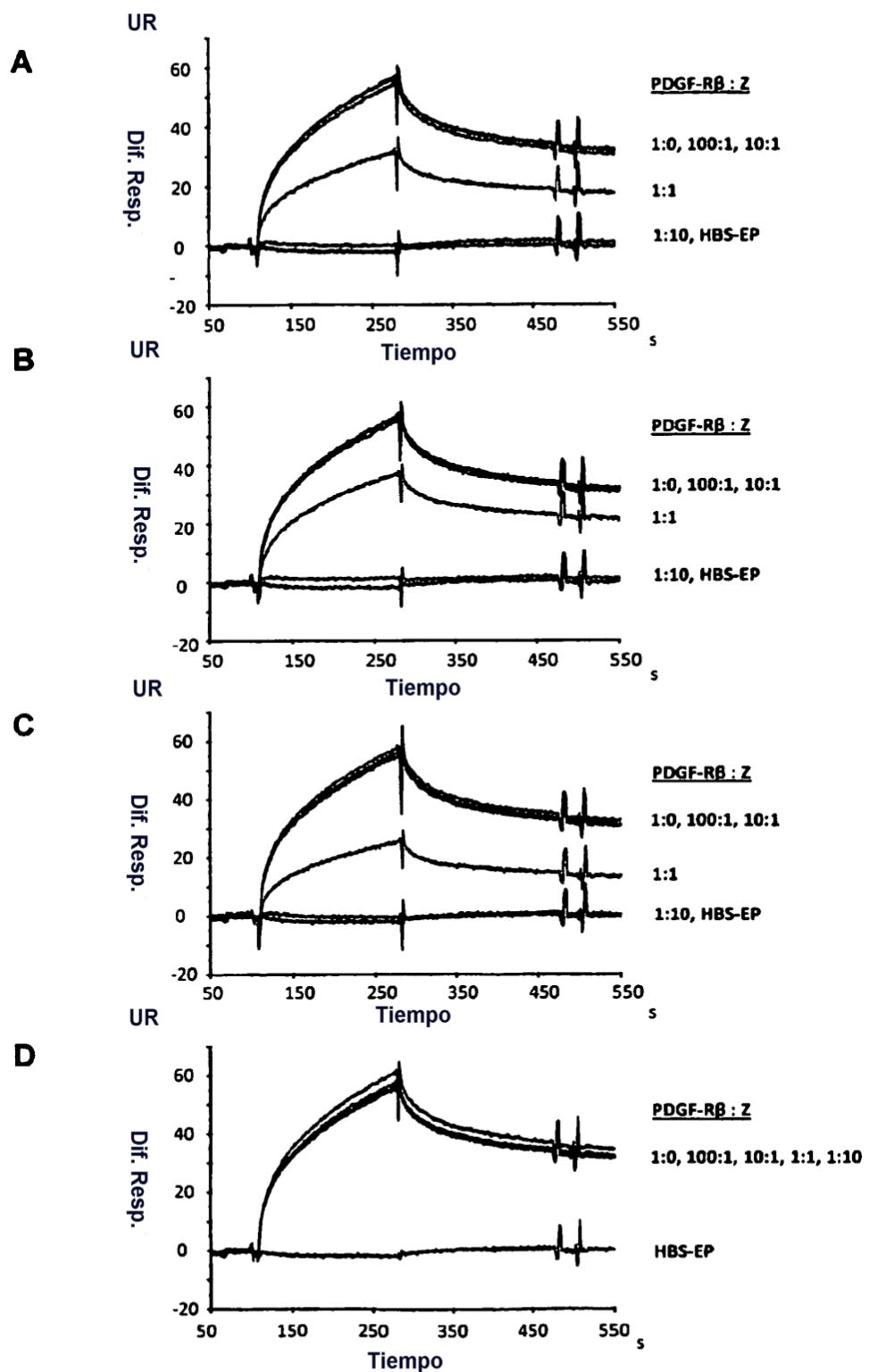


Figura 3

# ES 2 373 832 T3

**A**

	I		II	
ciclo 1:		100 nM (2x)		100 nM (2x)
ciclo 2:	50 nM (4x)	20 nM (4x)	50 nM (4x)	20 nM (4x)
	↓	↓	↓	↓
ciclo 3:	25 nM (6x)	4 nM (6x)	25 nM (6x)	4 nM (6x)
	↓	↓	↓	↓
ciclo 4:	12,5 nM (12x)	0,8 nM (12x)	12,5 nM (12x)	0,8 nM (12x)

Ia                    Ib                    IIa                    IIb

**B**

	1	2	3	4
ciclo 1:	100 nM (4x)	50 nM (4x)	100 nM (4x)	50 nM (4x)
	↓	↓	↓	↓
ciclo 2:	100 nM (6x) 25 nM (6x)	25 nM (6x)	100 nM (6x) 25 nM (6x)	25 nM (6x)
	↓	↓	↓	↓
ciclo 3:	50 nM (10x) 1 nM (10x)	1 nM (10x)	50 nM (10x) 1 nM (10x)	1 nM (10x)
	↓	↓	↓	↓
ciclo 4:	1 nM (20x) 0,1 nM (20x)	0,1 nM (20x)	1 nM (20x) 0,1 nM (20x)	0,1 nM (20x)
1a                    1b                    2			3a                    3b                    4	
1a perlas            1b perlas            2 perlas			3a perlas            3b perlas            4 perlas	

Figura 4

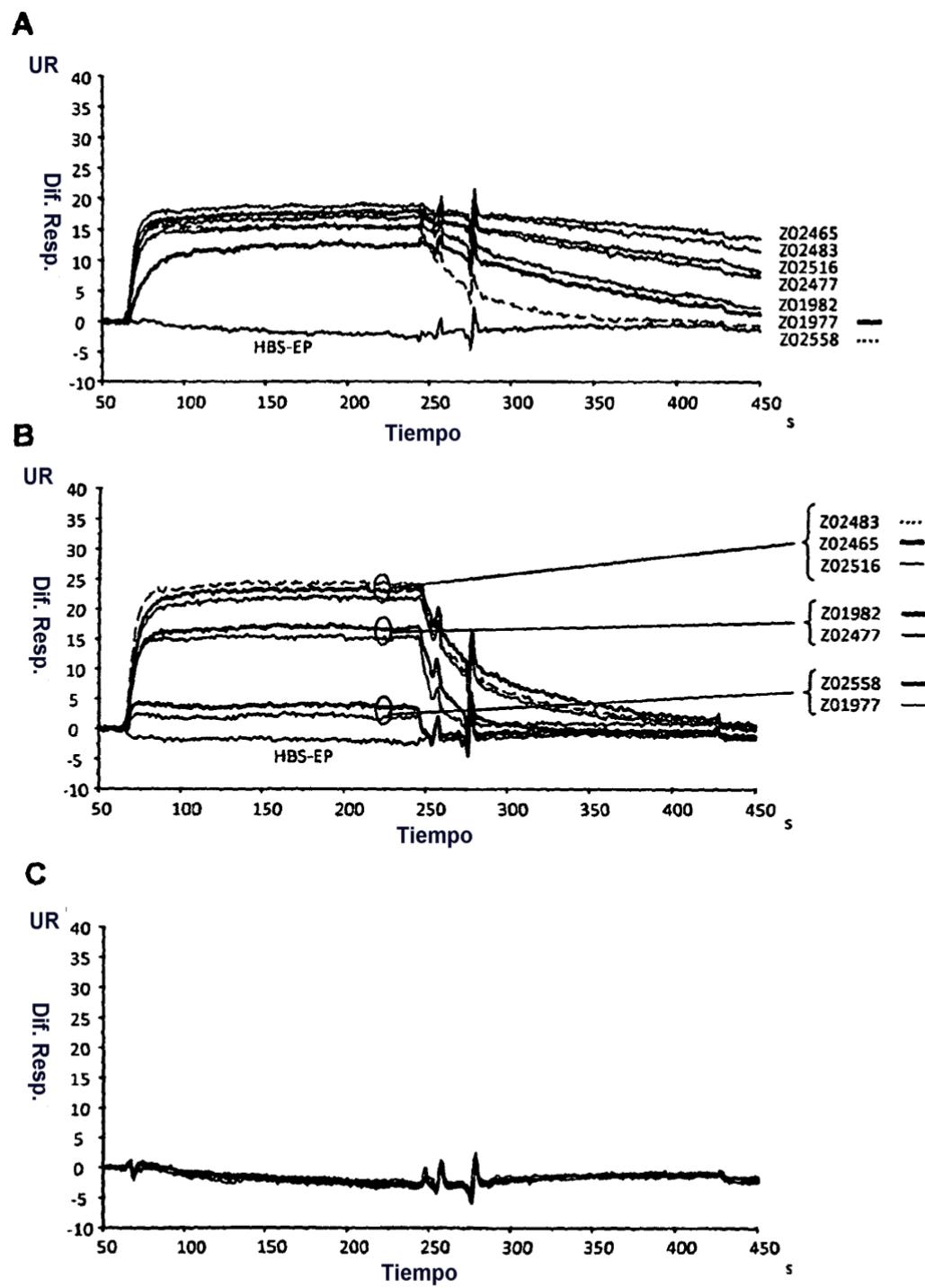


Figura 5

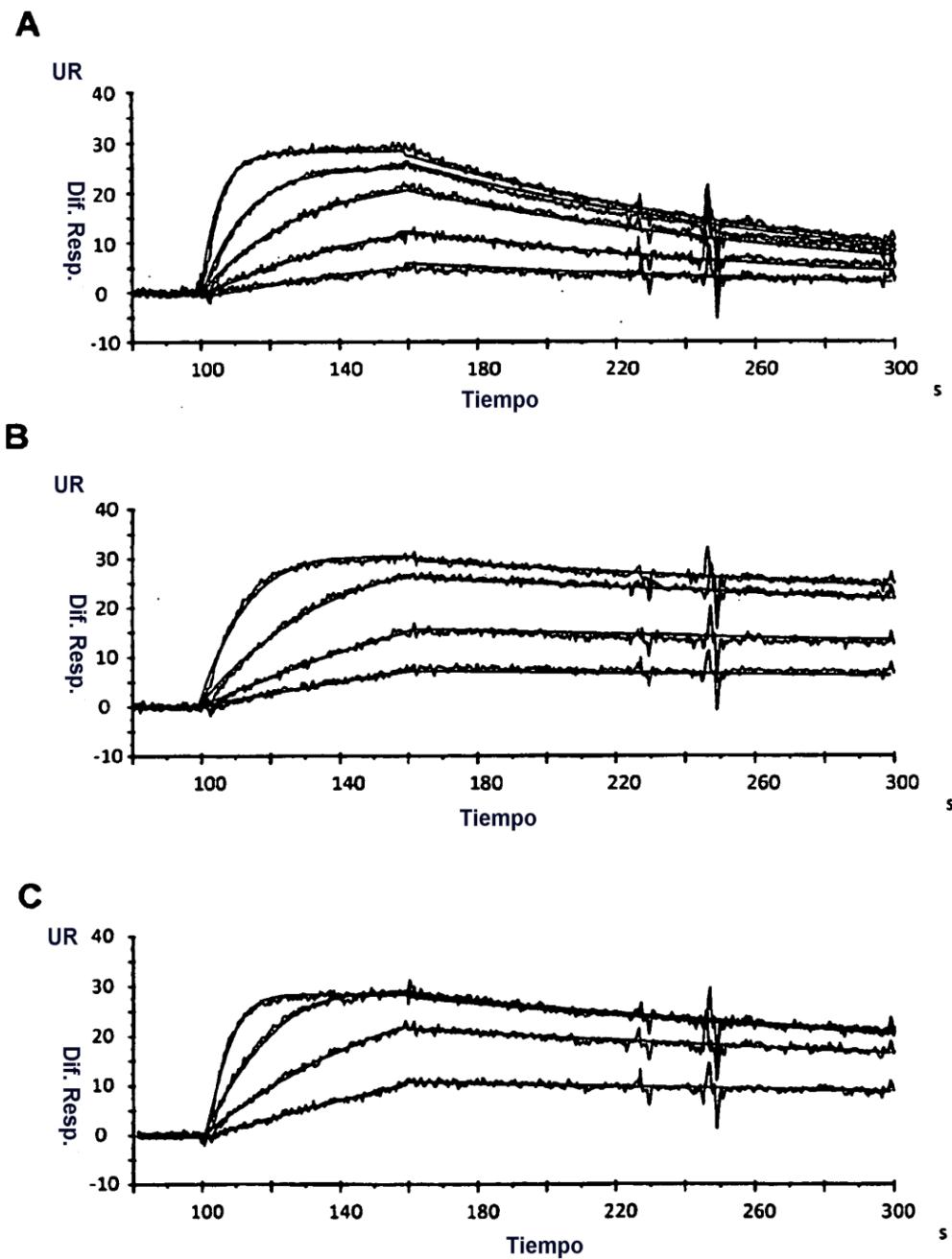
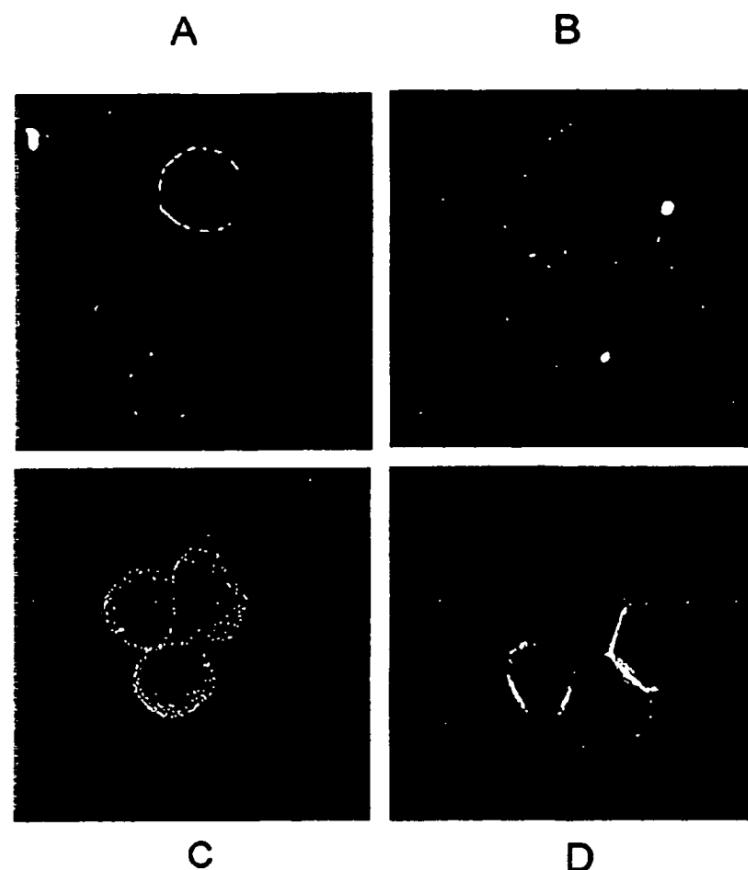


Figura 6



**Figura 7**

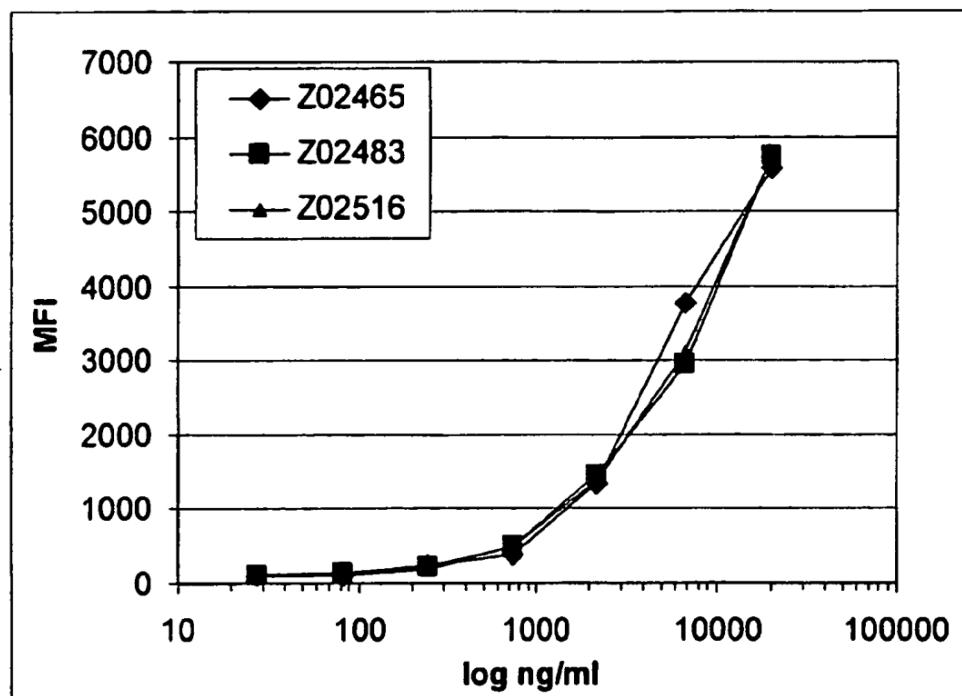


Figura 8