

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 859**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12N 5/00 (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.09.2005 E 10165159 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013 EP 2229956**

54 Título: **Construcciones multiméricas.**

30 Prioridad:

13.09.2004 US 608887 P
04.03.2005 US 658209 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.06.2013

73 Titular/es:

GENZYME CORPORATION (100.0%)
500 KENDALL STREET
CAMBRIDGE, MA 02142, US

72 Inventor/es:

SCARIA, ABRAHAM;
PECHAN, PETER y
WADSWORTH, SAMUEL

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 407 859 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

Construcciones multiméricas.

Campo de la invención

5 La invención se refiere a proteínas construidas de forma recombinante útiles para tratar la neovascularización patológica, por ejemplo, asma, artritis, cáncer, y degeneración macular.

Antecedentes de la invención

10 La neovascularización patológica es un componente clave de enfermedades como degeneración macular relacionada con la edad (AMD) húmeda, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, osteoartritis, y asma. También desempeña un papel importante en el crecimiento y propagación de tumores. La neovascularización está regulada por un delicado equilibrio de factores pro- y anti-angiogénicos.

Se sabe que el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) es necesario para la neovascularización. Se ha demostrado que la inhibición de la actividad VEGF inhibe la neovascularización en modelos animales de AMD, artritis y en diversos modelos de tumor. Los métodos usados para inhibir la actividad VEGF incluyen anticuerpos, proteínas de fusión receptoras, péptidos y pequeñas moléculas.

15 Se ha demostrado que las proteínas VEGF-R1 (Flt-1) y VEGF-R2 (KDR) se unen a VEGF con elevada afinidad. Tanto Flt-1 como KDR tienen siete dominios tipo Ig en su región extracelular. Se ha demostrado que el dominio 2 es esencial para la unión a VEGF. Fusiones de cada uno de los receptores solubles de longitud completa (dominios 1-7) y los dominios 1-3 con Fc de IgG se unen a VEGF de forma eficaz. Las fusiones de Fc de IgG con el dominio tipo Ig 2 solo, sin embargo, eran incapaces de unirse a VEGF, ya que eran una combinación de dominio tipo Ig 1 y 2.
20 Davis-Smyth, 1996. Por lo tanto, los dominios tipo Ig 1 y 3 parecen ser necesarios junto con el dominio 2 para la unión eficaz a VEGF.

Holash *et al.* (Proceedings of the National Academy of Science, vol. 99(17): 11393-11398 (2002)) describe polipéptidos de fusión adicionales que comprenden partes del receptor de VEGF-R1 fusionadas a la parte Fc de la cadena pesada de IgG1.

25 WO 00/75319 describe polipéptidos que son receptores Flt1 quiméricos modificados y se dice que tienen un perfil farmacocinético mejorado.

WO 97/44453 describe proteínas que son receptores quiméricos de VEGF y se dice que se unen a VEGF y que antagonizan su actividad angiogénica y proliferativa de las células endoteliales.

30 Olafsen *et al.* (Protein Engineering, Design & Selection, v. 17(4), p. 315-323 (2004)) describe la caracterización de fragmentos de anticuerpos anti-p185^{HER-2} (scFv-C_H3)₂ construidos por ingeniería genética.

Hu *et al.* (Cancer Research, v. 56(13), p. 3055-3061 (1996)) describe un fragmento de anticuerpo anti-antígeno carcinoembrionario (scFv-C_H3) construido por ingeniería genética y se dice que presenta focalización rápida y precisa de xenoinjertos.

Breve resumen de la invención

35 De acuerdo con un aspecto de la presente descripción, se proporciona una proteína de fusión. La proteína de fusión tiene la fórmula X-Y-Z. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un polipéptido de 5-25 restos aminoácidos. Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG.

40 Otro aspecto de la presente descripción es un polipéptido de fórmula X-Y-Z. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoácidos. Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG.

45 Otro aspecto más de la presente descripción es una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un polipéptido de 5-25 restos aminoácidos. Z es una parte Fc de una molécula de anticuerpo.

50 La presente descripción también proporciona una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoácidos. Z es una parte Fc de una molécula de anticuerpo.

55 Otro aspecto más de la presente descripción es un método para multimerizar un polipéptido X. Un polipéptido X se une a un polipéptido Z mediante un polipéptido Y para formar el polipéptido XYZ. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un polipéptido de 5-25 restos aminoácidos. Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG. El polipéptido XYZ que se forma se multimeriza.

Otro aspecto más de la presente descripción proporciona un método para multimerizar un polipéptido X. El polipéptido X se une a un polipéptido Z mediante un resto Y para formar el polímero XYZ. X comprende un polipéptido seleccionado entre el grupo compuesto por un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento. Y consta esencialmente de un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoacídicos. Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG. El polipéptido XYZ que así se forma se multimeriza.

En un aspecto de la presente descripción se proporciona un ácido nucleico. La molécula de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 (Flt-1); un enlazador; y un dominio de multimerización. La proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25.

En otro aspecto de la presente descripción se proporciona una proteína de fusión. La proteína de fusión comprende un dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 (Flt-1), un enlazador, y un dominio de multimerización. La proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25.

En otro aspecto de la presente descripción se proporciona un método *in vitro*. Se suministra una molécula de ácido nucleico a una célula de mamífero aislada. La molécula de ácido nucleico codifica una proteína de fusión que comprende un dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 (Flt-1); un enlazador; y un dominio de multimerización. La proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25. La expresión de la proteína de fusión está controlada por un promotor. Se forma una célula que expresa una proteína de fusión.

Otro aspecto más de la presente descripción es un método para suministrar una proteína de fusión a un mamífero. Se suministra una célula de mamífero que expresa la proteína de fusión a un mamífero. La célula expresa y secreta la proteína de fusión suministrando de este modo la proteína de fusión al mamífero. La proteína de fusión comprende un dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 (Flt-1), un enlazador, y un dominio de multimerización. La proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25.

Otro aspecto de la presente descripción es un método para suministrar una proteína de fusión a un mamífero. Se suministra una proteína de fusión que comprende un dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 (Flt-1), un enlazador, y un dominio de multimerización a un mamífero. La proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25. Como alternativa, puede suministrarse una construcción de ácido nucleico que codifica dicha proteína de fusión al mamífero, por lo cual el mamífero expresa la proteína de fusión.

Estos y otros aspectos de la presente descripción que se describirán en más detalle a continuación proporcionan a la técnica métodos y agentes para tratar enfermedades relacionadas con la proliferación e inflamación vascular. Los agentes pueden proporcionar estabilidad y biodisponibilidad aumentadas con relación a las formas naturales de las proteínas.

Ahora una parte de la descripción que está contenida en este documento proporciona los aspectos y realizaciones de la presente invención. Más particularmente, un primer aspecto de la presente invención proporciona una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en la que: X comprende el dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 pero carece de los dominios tipo Ig 1 y 3 de VEGF-R1, estando dicho dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 unido covalentemente al resto Z mediante el resto Y; Y consta de un polipéptido de 5-25 restos aminoacídicos; y Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG o una parte Fc de una molécula de anticuerpo.

En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una composición que comprende esta proteína de fusión de la invención, comprendiendo dicha composición adicionalmente uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método para multimerizar un polipéptido X, comprendiendo el método: unir un polipéptido X a un polipéptido Z mediante un polipéptido Y para formar un polipéptido XYZ, en el que: X comprende el dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 pero carece de los dominios tipo Ig 1 y 3 de VEGF-R1, estando dicho dominio tipo Ig 2 de VEGF-R1 unido covalentemente al polipéptido Z mediante el polipéptido Y; Y consta de un polipéptido de 5-25 restos aminoacídicos; y Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG o una parte Fc de una molécula de anticuerpo; por lo cual el polipéptido XYZ multimeriza.

En aspectos adicionales más, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de la presente invención, un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico, una célula de mamífero que comprende la molécula de ácido nucleico o el vector, y un método *in Vitro* que comprende suministrar la molécula de ácido nucleico o el vector a una célula de mamífero aislada para formar una célula que exprese la proteína de fusión.

En más aspectos adicionales, la presente invención proporciona la proteína de fusión, el ácido nucleico, el vector o la célula de mamífero de la presente invención, para su uso en el tratamiento de un mamífero. En una realización, el mamífero tiene degeneración macular relacionada con la edad húmeda o retinopatía diabética proliferativa. En otra realización, el mamífero tiene cáncer. En otra realización, el mamífero tiene artritis reumatoide. En otra realización, el mamífero tiene asma. En otra realización, el mamífero tiene osteoporosis.

Se exponen aspectos y realizaciones adicionales de la presente invención en las reivindicaciones adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

Fig. 1. Región flexible del enlazador 9-Gly en la construcción D2-9Gly-Fc. La flexibilidad relativa predicha por el método de Karpus y Schultz (1985) muestra al enlazador de 9 unidades de poliglicina (9-Gly) (aminoácidos 94 a

103) en la proteína D2-9Gly-Fc como una región con mayor flexibilidad que el promedio (>1) en comparación con la construcción D2-Fc que no contiene el enlazador 9-Gly. Ambas proteínas de fusión contienen secuencias de aminoácidos idénticas encerradas en los recuadros: sp - péptido señal (aminoácidos -24 a -1), dominio 2 de Flt-1 (aminoácidos 1 a 93) y los restos de IgG1-Fc (244 aminoácidos). La flecha representa el sitio de escisión por la peptidasa señal predicha usando el programa SignalP V2.0 (Nielsen et al., 1997).

Fig. 2. Actividad biológica de D2-9Gly-Fc frente a D2-Fc. Se cultivaron células 293 en el medio de privación (M199 + FCS al 5%) y se transfectaron con plásmidos que contenían los casetes de expresión D2-9Gly-Fc y D2-Fc bajo el control de promotor CMV. Se recogió el medio condicionado (CM) 72 h después. Se sembraron HUVEC en placas de 96 pocillos (2E3 células/pocillo) en medio de privación + VEGF (10 ng/ml) y se añadieron 50 μ l de CM más VEGF (10 ng/ml) 24 h después. Los controles (+/- VEGF) se incubaron con CM a partir de la transfección de plásmido pEGFP de control (Clontech; pEGFP lleva una variante cambiada a rojo de la proteína fluorescente verde de tipo silvestre (GFP) que se ha optimizado para una fluorescencia más brillante y mayor expresión en células de mamífero). El control positivo se trató con 50 ng de proteína recombinante Flt-1-IgG (R&D Systems). Las HUVEC se ensayaron para la proliferación 3 días después del tratamiento usando el reactivo CellTiter 96[®] AQueous (Promega). Los datos representan las medias de los valores promedio de la OD490 de dos experimentos cada uno ensayado por triplicado.

Fig. 3. Análisis de transferencia de Western de D2-9Gly-Fc y D2-Fc. Parece que el tamaño de las proteínas tanto D2-9Gly-Fc como D2-Fc es el doble de grande cuando migra en gel no reductor en comparación con la migración en gel reductor. Las proteínas se cargaron a partir del medio condicionado después de que las transfecciones en células 293 de plásmidos que expresan D2-9Gly-Fc y D2-Fc se separaran por electroforesis en SDS y se transfirieran a una membrana de PVDF. La transferencia se sondeó con anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG1 humana y de conejo anti-IgG de cabra-HRP.

Fig. 4. Proteínas híbridas sFlt-1 que contienen el enlazador 9Gly y VEGF Ex3. Comparación de estructura de D2-9Gly-Ex3/CH3 con proteínas construidas previamente. Las tres proteínas contienen idéntica secuencia de aminoácidos del dominio 2 de Flt-1, que consta de 24 aminoácidos del péptido señal de Flt-1 y 93 aminoácidos del dominio 2 de Flt-1. D2-9Gly-Ex3/CH3 contiene 9 aminoácidos del enlazador 9Gly, 14 aminoácidos de VEGF Ex3 y 120 aminoácidos de la región CH3 de Fc de cadena pesada de IgG1 humana.

Fig. 5. Actividad biológica de D2-9Gly-Ex3/CH3 frente a D2-9Gly-Fc. La proteína D2-9Gly-Ex3/CH3, en la que el dominio 2 está conectado a la región CH3 a través del enlazador 9Gly y VEGF Ex3, también inhibe de forma eficaz la proliferación de HUVEC dependiente de VEGF en comparación con las proteínas de control D2-9Gly-Fc y D2-Fc. Se usaron 50 ng de Flt-1-IgG recombinante (R&D Systems) como control.

Fig. 6. Ensayo de proliferación de HUVEC que compara la actividad proteica de D2-(Gly₄Ser)₃-Fc con D2-9Gly-Fc y D2-9Gly-Ex3/CH3.

Fig. 7. Transferencia de Western. Se separaron las proteínas (no reducidas y reducidas) del medio condicionado de células 293 transfectadas (15 μ l de CM) con plásmidos que expresaban proteínas (1): D2-9Gly-Fc; (2): D2-(G₄S)₃-Fc y (3): EGFP por electroforesis en SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF. La transferencia se sondeó con anticuerpos de cabra anti-Fc de IgG1 humana y de conejo anti-IgG de cabra-HRP.

Fig. 8. Combinaciones con/sin enlazador 9Gly o VEGF Ex3. Comparación de estructura de tres nuevas proteínas con o sin enlazador 9Gly y/o VEGF Ex3, D2-9Gly-CH3, D2-CH3 y D2-Ex3/CH3.

Fig. 9. Ensayo de proliferación de HUVEC con las construcciones Flt-1(D2) con combinaciones 9Gly, Ex3 y CH3. Se comparó el medio condicionado de células 293 (5 μ l) que contenían las proteínas D2-Ex3/CH3, D2-9Gly-CH3 y D2-CH3 con D2-9Gly-Fc y D2-9Gly-Ex3/CH3.

Fig. 10. Transferencia de Western. Se transfectaron células 293 con plásmidos que expresaban: (1) D2-9Gly-Fc; (2) D2-9Gly-CH3 (52/26 kDa); y (3) D2-CH3 (50/25 kDa). Las proteínas del medio condicionado de células 293 (15 μ l de CM no reducido y/o reducido) se separaron por electroforesis en SDS y se transfirieron a una membrana de PVDF. La transferencia se sondeó con conjugado anti-VEGF-R1 humano HRP (R&D Systems).

Fig. 11. Ensayo de unión de VEGF "in vitro". Se diluyeron en serie los medios condicionados de células 293 que contenían concentraciones conocidas tanto de D2-9Gly-Fc como de los receptores solubles de control Flt-1 D(1-3) (que varían en las concentraciones de 0,29 - 150 pM) y se mezclaron con VEGF 10 pM. Después se midió la cantidad de VEGF no unido por ELISA. D2-9Gly-Fc se une a VEGF con mayor afinidad que todas las demás construcciones. "n" representa la cantidad de experimentos independientes (ensayo de transfección y unión).

Fig. 12. La cinética de unión de las construcciones solubles de Flt-1 se midió por resonancia de plasmón superficial con un instrumento BIAcore. Las construcciones sFlt-1 se inmovilizaron sobre un chip detector, y se inyectó VEGF165 a concentraciones que variaban de 0,2 a 15 nM. Los sensogramas se evaluaron usando el programa BIA Evaluation, se determinaron las constantes de velocidad K_a y K_d y se calculó la constante de disociación (KD) a partir de la proporción $K_d/K_a = KD$. Un menor valor de KD significa mejor afinidad.

Fig. 13A-13C. La Fig. 13A muestra los niveles de expresión de las construcciones de Flt-1 que tenían diversos enlazadores. La Fig. 13B muestra la dimerización o multimerización de construcciones de Flt-1 que tenían diversos enlazadores y un resto CH3 de Fc de IgG1. La diferencia entre las condiciones no reducidas y reducidas indica que las proteínas habían multimerizado. La Fig. 13C muestra la bioactividad inhibitoria de las construcciones de Flt-1 indicadas presentes en medio condicionado en un ensayo de proliferación de HUVEC en presencia de VEGF. Cada una de las construcciones mostró actividad inhibitoria que se acerca a los niveles de proliferación de las HUVEC en ausencia de VEGF.

Fig. 14. Usando un modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) de neovascularización retiniana (NV),

se administró una de las construcciones de Flt-1 a los ojos del ratón y se determinó la neovascularización. Los ratones se expusieron a condiciones hiperóxicas. La cantidad de acontecimientos neovasculares se determinó en los ojos tratados en comparación con los acontecimientos en los ojos no tratados de los mismos animales. El animal se consideró un "respondedor" si había una reducción de más del 50% en los acontecimientos neovasculares.

5 Descripción detallada de la invención

Es un descubrimiento de la presente invención que el dominio tipo Ig 2 Flt-1 sin los dominios 1 y 3 es capaz de unirse de forma eficaz a VEGF y de inhibir la proliferación de las células endoteliales dependiente de VEGF. El dominio 2 puede unirse covalentemente a un dominio de multimerización mediante un enlazador. Los enlazadores son típicamente cadenas polipeptídicas. La longitud de la cadena puede ser de 6, 7, 9, 11, 13, 15 o más restos aminoacídicos, pero típicamente está entre 5 y 25 restos. Dependiendo de la longitud y la composición de la cadena lateral, un enlazador puede tener, aunque no lo necesita, una flexibilidad mayor de la promedio. La flexibilidad puede calcularse usando algoritmos conocidos en la técnica. Los dominios de multimerización son aquellas partes de las proteínas multiméricas que promueven la asociación de subunidades para forma, por ejemplo, dímeros, trímeros, tetrámeros, etc. Las proteínas recombinantes adecuadas para la unión eficaz a VEGF y/o la inhibición de la proliferación de células endoteliales dependiente de VEGF se seleccionan entre el grupo compuesto por las SEC ID N° 2, 8, 21, 23, y 25.

Además, se ha descubierto que los dominios de multimerización y los enlazadores pueden usarse con una diversidad de proteínas diferentes o partes de proteínas para inducir la multimerización. Dichas proteínas pueden ser aquellas que se unen a un ligando o receptor solamente cuando se multimerizan, o pueden ser aquellas cuya afinidad de unión se potencia cuando se multimerizan. Las proteínas para la multimerización adecuadas incluyen receptores extracelulares (que incluyen partes de los mismos), regiones variables de anticuerpos, citoquinas, quimioquinas, y factores de crecimiento. Las proteínas adecuadas incluyen receptores tirosina quinasa y receptores serina-treonina quinasa. Los ejemplos específicos de receptores extracelulares incluyen el receptor de EGF, receptores acoplados a proteína G, el receptor de FGF, receptores Fc, receptores de células T, etc. Los ejemplos de regiones variables de anticuerpos incluyen Fab, F(ab')₂, y ScFv. Los ejemplos de citoquinas incluyen GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IL-21, IL-23, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , MIP-1 α , MIP-1 β , TGF- β , TNF α , y TNF β . Los ejemplos de quimioquinas incluyen BCA-1/BLC, BRAK, quimioquina CC-2, CTACK, CXCL-16, ELC, ENA, ENA-70, ENA-74, ENA-78, eotaxina, exodus-2, fractalquina, GCP-2, GRO, GRO alfa (MGSA), GRO-beta, GRO-gamma, HCC-1, HCC-4, I-309, IP-10, I-TAC, LAG-1, LD78-beta, LEC/NCC-4, LL-37, linfotactina, MCP, MCAF (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, MDC-2, MDC-4, MEC/CCL28, MIG, MIP, MTP-1 alfa, MIP-1 beta, MIP-1 delta, MIP-3/MPIF-1, MIP-3 alfa, MIP-3 beta, MIP-4 (PARC), MIP-5, NAP-2, PARC, PF-4, RANTES, RANTES-2, SDF-1 alfa, SDF-1 beta, TARC, y TECK. Los ejemplos de factores de crecimiento incluyen anfirregulina humana, proteínas de angiogénesis humanas, ACE humana, angiogenina humana, angiopoyetina humana, angiostatina humana, betacelulina humana, BMP humana, BMP-13 humana/CDMP-2, BMP-14 humana/CDMP-1, BMP-2 humana, BMP-3 humana, BMP-4 humana, BMP-5 humana, BMP-6 humana, BMP-7 humana, BMP-8 humana, BMP-9 humana, factores estimuladores de colonias humanos, ligando flt3 humano, G-CSF humano, GM-CSF humano, M-CSF humano, factor de crecimiento de tejido conectivo humano, cripto-1 humano, cryptic humano, ECGF humano, EGF humano, EG-VEGF humano, eritropoyetina humana, fetuina humana, FGF humano, FGF-1 humano, FGF-10 humano, FGF-16 humano, FGF-17 humano, FGF-18 humano, FGF-19 humano, FGF-2 humano, FGF-20 humano, FGF-3 humano, FGF-4 humano, FGF-5 humano, FGF-6 humano, FGF-7 humano/KGF, FGF-8 humano, FGF-9 humano, FGF-ácido humano, FGF-básico humano, GDF-11 humano, GDF-15 humano, factor liberador de la hormona del crecimiento humano, HB-EGF humano, heregulina humana, HGF humano, IGF humano, IGF-I humano, IGF-II humano, inhibina humana, KGF humano, LCGF humano, LIF humano, factores misceláneos de crecimiento humanos, MSP humana, miostatina humana, propéptido de miostatina humano, factor de crecimiento nervioso humano, oncostatina M humana, PD-ECGF humano, PDGF humano, PDGF humano (homodímero AA), PDGF humano (heterodímero AB), PDGF humano (homodímero BB), PDGF humano (homodímero CC), PIGF humano, PIGF humano, PIGF-1 humano, PIGF-2 humano, SCF humano, SMDF humano, factores de crecimiento de células madre humanas, SCGF-alfa humano, SCGF-beta humano, trombopoyetina humana, factor de crecimiento transformante humano, TGF-alfa humano, TGF-beta humano, y VEGF humano.

La proteína receptora Flt-1 tiene una parte extracelular que comprende siete dominios tipo Ig. Estos están localizados en los restos con los números 32...123, 151...214, 230...327, 335...421, 428...553, 556...654, y 661...747 del número de acceso a Genbank P17948, véase también la SEC ID N° 15. Los restos con los números 1-26 comprenden una secuencia señal. La proteína Flt-1 está codificada por la secuencia de ADN mostrada en el número de acceso a Genbank NM_002019 (SEC ID N° 14).

Los dominios de multimerización que pueden usarse de acuerdo con la presente descripción son conocidos en la técnica. Pueden usarse las secuencias de la parte Fc de la cadena pesada de IgG1 o IgG2 gamma, por ejemplo, CH3 solo (aminoácidos 371-477) o los dominios tanto CH2 como CH3 (aminoácidos 247-477). La parte Fc de las moléculas Ig es la que se obtiene por escisión de moléculas de anticuerpo completo con la enzima papaína. Pueden usarse otros medios para obtener estas partes. Para la secuencia proteica de la cadena pesada de IgG1 gamma, véase el número de acceso a Genbank Y14737 y la SEC ID N° 10. Pueden usarse otras regiones Fc, por ejemplo, de otros tipos de IgG y de anticuerpos IgA, IgM, IgD, o IgE. También puede usarse la región de multimerización de VEGF. Se muestra una secuencia de ADN que codifica VEGF en el número de acceso a Genbank NM_003376 y la SEC ID N° 11. Se muestra una secuencia de aminoácidos de VEGF en el número de acceso a Genbank CAC19513 y la SEC ID N° 12. La región de multimerización de VEGF (SEC ID N° 13), codificada por el exón 3 de VEGF (VEGF Ex3), está en aproximadamente los restos aminoacídicos 75-88 de la proteína VEGF (SEC ID N° 12). Los dominios de multimerización causarían que al menos el 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de las proteínas de fusión monoméricas miren sobre un gel de poliacrilamida no desnaturizante a una velocidad apropiada para un multímero. La glicosilación puede afectar a la migración de una proteína en un gel. Aunque aquí se muestran secuencias particulares, también pueden usarse variantes tales como variantes alélicas. Típicamente dichas variantes tendrán al menos un 85%, 90%, 95%, 97%, 98%, o 99% de identidad con la secuencia descrita.

La multimerización puede ensayarse, por ejemplo, usando geles reductores y no reductores, como se demuestra en este documento. La multimerización también puede ensayarse por detección de afinidad de unión aumentada de una proteína por su ligando/receptor. Pueden usarse ensayos de resonancia de plasmón superficial BiaCore™ a este respecto. Estos ensayos detectan cambios en la masa midiendo los cambios en el índice de refracción en una capa acuosa cercana a la superficie de un chip detector. Cualquier método conocido en la técnica puede usarse para detectar la multimerización.

Los restos enlazadores de acuerdo con la presente descripción pueden estar compuestos por, por ejemplo, 5-100 restos aminoacídicos, 5-75 restos aminoacídicos, 5-50 restos aminoacídicos, 5-25 restos aminoacídicos, 5-20 restos aminoacídicos, 5-15 restos aminoacídicos, 5-10 restos aminoacídicos, o 5-9 restos aminoacídicos. Los ejemplos de enlazadores útiles incluyen: gly₉ (SEC ID N° 27), glu₉ (SEC ID N° 28), ser₉ (SEC ID N° 29), gly₅cyspro₂cys (SEC ID N° 30), (gly₄ser)₃ (SEC ID N° 31), SerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEC ID N° 32), ProSerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEC ID N° 13), GlyAspLeulleTyrArgAsnGlnLys (SEC ID N° 26), y Gly₉ProSerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEC ID N° 34). Otros enlazadores polipeptídicos que pueden usarse incluyen una poliglicina de diferentes longitudes, incluyendo de 5, 7, o 30 restos. Además, pueden usarse otras partes de Flt-1 como enlazador, por ejemplo, el dominio 3 de Flt-1. Véase la SEC ID N° 15. Los restos enlazadores también pueden crearse a partir de otros polímeros, tales como polietilenglicol. Dichos enlazadores pueden tener de 10 a 1000, 10-500, 10-250, 10-100, o 10-50 unidades monoméricas de etilenglicol. Los polímeros adecuados deben ser de un tamaño similar al tamaño ocupado por el intervalo apropiado de restos aminoacídicos. Un polímero de tamaño ajustado típico proporcionaría un espaciado de aproximadamente 10-25 angstrom.

A pesar de la generalidad de la descripción anterior, sin embargo, la presente invención se refiere a una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en la que: X comprende una porción del receptor del VEGF, Y es un resto enlazador y Z es un dominio de multimerización, en donde el resto enlazador Y es un polipéptido de 5-50 restos aminoacídicos que tiene una flexibilidad por encima de la media como se determina por el método de predicción de la flexibilidad de Karpus & Schultz, 1985, *Naturwiss*, 72: 212-213, y en donde dicha proteína de fusión se une a VEGF cuando se multimeriza.

Las proteínas de fusión de acuerdo con la presente descripción, incluyendo las proteínas de fusión de la presente invención, pueden crearse por cualquier medio conocido en la técnica. Aunque dichas proteínas pueden crearse de forma sintética, o uniendo partes que están hechas, también puede usarse la producción recombinante. Puede producirse una secuencia génica fusionada usando las herramientas convencionales de ADN recombinante. La secuencia génica fusionada puede insertarse en un vector, por ejemplo, un vector viral o plasmídico, para replicar la secuencia génica fusionada. Puede introducirse una secuencia promotora que es funcional en la célula receptora final cadena arriba de la secuencia génica promotora. Los promotores usados pueden ser constitutivos, inducibles o reprimibles. Se conocen bien en la técnica ejemplos de cada tipo. El vector puede introducirse en una célula hospedadora o mamífero por cualquier medio conocido en la técnica. Los vectores adecuados que pueden usarse incluyen adenovirus, virus adeno-asociados, retrovirus, lentivirus, y plásmidos. Si el vector está en un vector viral y el vector se ha empaquetado, entonces pueden usarse los viriones para infectar células. Si se usa ADN desnudo, entonces pueden usarse los procedimientos de transfección o transformación que sean apropiados para las células hospedadoras particulares. Pueden usarse formulaciones de ADN desnudo utilizando polímeros, liposomas, o nanoesferas para el suministro de genes de fusión. Las células que pueden transformarse o transfectarse con construcciones recombinantes de acuerdo con la invención pueden ser cualesquiera que sean convenientes para el especialista. Los tipos celulares ejemplares que pueden usarse incluyen bacterias, levaduras, células de insecto, y de mamífero. Entre las células de mamífero, pueden elegirse células de mucho tipos tisulares, según sea conveniente. Las células ejemplares que pueden usarse son fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, células madres, células hematopoyéticas, células epiteliales, miocitos, células neuronales, y queratinocitos. Estas células pueden usarse para producir proteínas *in vitro*, o pueden suministrarse a mamíferos incluyendo seres humanos para producir las proteínas codificadas *in vivo*. Este medio de suministro es una alternativa al suministro de ácido nucleico a un mamífero, al suministro de un vector viral a un mamífero, y al suministro de la proteína de fusión a un mamífero.

Las composiciones de proteína o ácidos nucleicos pueden estar en vehículos, tales como tampones, vehículos acuosos o lipófilos, vehículos estériles o no estériles, pirogénicos o no pirogénicos. Los vehículos no pirogénicos son útiles para formulaciones inyectables. Las formulaciones pueden ser líquidas o sólidas, por ejemplo, liofilizadas. Las formulaciones también pueden administrarse en forma de aerosoles. Las composiciones pueden contener una o más proteínas de fusión o uno o más ácidos nucleicos, o tanto proteínas de fusión como ácidos nucleicos. Las proteínas de fusión y/o los ácidos nucleicos en una composición pueden ser homogéneos, en cuyo caso se formarán proteínas homomultiméricas, o pueden ser heterogéneos en la composición, en cuyo caso se formarán proteínas heteromultiméricas. En el caso de heteromultímeros, típicamente el resto X variará entre proteínas de fusión, pero el resto Z será igual entre las proteínas de fusión.

Pueden proporcionarse proteínas de fusión a una célula u hospedador mamífero por cualquier medio conocido en la técnica. Puede suministrarse la proteína a la célula u hospedador. Puede administrarse el ácido nucleico a la célula u hospedador. Pueden administrarse las células transformadas o transfectadas a la célula u hospedador. En el último caso, se desean células del mismo fondo genético para reducir el rechazo de trasplante.

Las células adecuadas para el suministro a animales hospedadores mamíferos incluyen cualquier tipo celular de mamífero de cualquier órgano, tumor, o línea celular. Por ejemplo, pueden usarse células humanas, murinas, de cabra, ovinas, bovinas, de perro, de gato, y porcinas. Los tipos celulares adecuados para su uso incluyen, sin limitación, fibroblastos, hepatocitos, células endoteliales, queratinocitos, células hematopoyéticas, células epiteliales, miocitos, células neuronales, y células madre.

Los medios de suministro de proteínas de fusión o ácidos nucleicos que codifican proteínas de fusión incluyen el suministro de células que expresan las proteínas de fusión, el suministro de las proteínas de fusión, y el suministro de ácidos nucleicos que codifican las proteínas de fusión. Las proteínas de fusión, células, o ácidos nucleicos pueden suministrarse directamente al órgano o tumor deseado, por ejemplo, por inyección, cateterismo, o

endoscopia. También pueden suministrarse por vía intravenosa, intrabronquial, intratumoral, intratecal, intramuscular, intraocular, tópica, subcutánea, transdérmica o *per os*. Los pacientes que pueden tratarse de forma eficaz incluyen aquellos con degeneración macular relacionada con la edad húmeda, retinopatía diabética proliferativa, artritis reumatoide, osteoartritis, uveítis, asma, y cáncer. Los tratamientos mejorarán los síntomas y/o los marcadores de la enfermedad y/o la gravedad de la enfermedad.

Los ácidos nucleicos pueden suministrarse a mamíferos, y en particular, a seres humanos, en cualquier vector deseado. Estos incluyen vectores virales o no virales, incluyendo vectores adenovirales, vectores virales adeno-asociados, vectores retrovirales, vectores lentivirales, y vectores plasmídicos. Los tipos ejemplares de virus incluyen VHS (virus del herpes simple), adenovirus, AAV (virus adeno-asociado), VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), VIB (virus de la inmunodeficiencia bovina), y VLM (virus de la leucemia murina). Los ácidos nucleicos pueden administrarse en cualquier formato deseado que proporcione niveles de suministro suficientemente eficaces, incluyendo en partículas virales, en liposomas, en nanopartículas, y en complejo con polímeros.

Pueden usarse combinaciones de tratamientos con proteína y ácido nucleico. Por ejemplo, puede administrarse una proteína de fusión de acuerdo con la presente descripción, por ejemplo, una proteína de fusión de acuerdo con la presente invención a un paciente. Si se observa una respuesta favorable, entonces puede administrarse una molécula de ácido nucleico que codifique la proteína de fusión para un efecto a largo plazo. Como alternativa, la proteína y el ácido nucleico pueden administrarse de forma simultánea o aproximadamente simultánea. En otra alternativa, puede administrarse un anticuerpo o proteína de fusión para un ligando seguido de o de forma concomitante con un anticuerpo o compañero de fusión para un receptor. Otra opción emplea una combinación de ácidos nucleicos en la que uno codifica un anticuerpo y otros codifica una proteína de fusión. Algunos anticuerpos que pueden emplearse en combinación con las construcciones de Flt-1 de la presente descripción, por ejemplo, en combinación con las construcciones Flt-1 de la presente invención (sea en forma de proteína o de ácido nucleico) son bevacizumab y ranibizumab, ambos dirigidos contra VEGF. Estos son particularmente útiles para tratar el cáncer y la degeneración macular, respectivamente.

La práctica de la presente descripción, incluyendo la práctica de la presente invención emplea, salvo que se indique de otro modo, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que pertenecen a las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la bibliografía, tal como, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Segunda Edición* (Sambrook et al., 1989); *Current Protocols In Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al., eds., 1987); *Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, ed., 1984); *Animal Cell Culture* (R.I. Freshney, ed., 1987); *Methods In Enzymology* (Academic Press, Inc.); *Handbook Of Experimental Immunology* (D.M. Wei & C.C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J.M. Miller & M.P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols In Immunology* (J.E. Coligan et al, eds., 1991); *Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane eds. (1988)); y *PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995)).

Un vehículo de suministro de genes es cualquier molécula que puede transportar polinucleótidos insertados al interior de una célula hospedadora. Ejemplos de vehículos de suministro de genes son liposomas, polímeros biocompatibles, incluyendo polímeros naturales y polímeros sintéticos; lipoproteínas; polipéptidos; polisacáridos; lipopolisacáridos; envueltas virales artificiales; partículas metálicas; y bacterias, virus, tales como baculovirus, adenovirus y retrovirus, vectores bacteriófagos, cósmidos, plasmídicos, fúngicos y otros vehículos de recombinación típicamente usados en la técnica que se han descrito para la expresión en una diversidad de hospedadores eucariotas y procariontes, y pueden usarse para terapia génica así como para la simple expresión de proteínas.

Suministro de genes, transferencia génica, y similares, como se usan en este documento, son términos que se refieren a la introducción de un polinucleótido exógeno (a veces mencionado como "transgén") en una célula hospedadora, independientemente del método usado para la introducción. Dichos métodos incluyen una diversidad de técnicas bien conocidas tales como transferencia génica mediada por vector (por, por ejemplo, infección/transfección vírica, o diversos complejos de suministro de genes basados en proteínas o basados en lípidos diferentes) así como técnicas que facilitan el suministro de polinucleótidos "desnudos" (tal como electroporación, suministro por "pistola génica" y diversas técnicas diferentes usadas para la introducción de polinucleótidos). El polinucleótido introducido puede mantenerse de forma estable o transitoria en la célula hospedadora. El mantenimiento estable típicamente requiere que el polinucleótido introducido contenga un origen de replicación compatible con la célula hospedadora o se integre en un replicón de la célula hospedadora tal como un replicón extracromosómico (por ejemplo, un plásmido) o un cromosoma nuclear o mitocondrial. Se sabe que varios vectores son capaces de mediar la transferencia de genes a células de mamífero, que se conocen en la técnica y se describen en este documento.

El polinucleótido exógeno se inserta en un vector tal como adenovirus, adenovirus parcialmente eliminado, adenovirus completamente eliminado, virus adeno-asociado (AAV), retrovirus, lentivirus, plásmido desnudo, complejo plásmido/liposoma, etc. para el suministro al hospedador mediante vía intravenosa, intramuscular, a través de la porta u otra vía de administración. Los vectores de expresión que pueden usarse en los métodos y composiciones de la presente descripción, por ejemplo, en las composiciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores virales. Uno de los métodos más frecuentemente usados de administración de terapia génica, tanto *in vivo* como *ex vivo*, es el uso de vectores virales para el suministro del gen. Se conocen muchas especies de virus, y muchas se han estudiado para propósitos de terapia génica. Los vectores virales más habitualmente usados incluyen aquellos derivados de adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) y retrovirus, incluyendo lentivirus, tales como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

El adenovirus es un virus de ADN nuclear, sin envuelta con a genoma de aproximadamente 36 kb, que se ha caracterizado bien a través de estudios en genética clásica y biología molecular (Hurwitz, M.S., *Adenoviruses Virology*, 3ª edición, Fields et al., eds., Raven Press, Nueva York, 1996; Hitt, M.M. et al., *Adenovirus Vectors, The Development of Human Gene Therapy*, Friedman, T. ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York 1999).

Los genes virales se clasifican en unidades transcripcionales tempranas (denominadas E1-E4) y tardías (denominadas L1-L5), que se refieren a la generación de dos clases temporales de proteínas virales. La demarcación de estos acontecimientos es la replicación de ADN viral. Los adenovirus humanos se dividen en numerosos serotipos (aproximadamente 47, numerados en consecuencia y clasificados en 6 grupos: A, B, C, D, E y F), en base a propiedades que incluyen hemaglutinación de glóbulos rojos, oncogenicidad, composiciones y homologías de ADN y aminoácidos proteicos, y relaciones antigénicas.

Los vectores adenovirales recombinantes tienen varias ventajas para su uso como vehículos de suministro de genes, incluyendo el tropismo por células tanto en división como no en división, potencial patogénico mínimo, capacidad de replicarse a un elevado título para la preparación de reservas de vector, y el potencial de portar grandes insertos (Berkner, K.L., *Curr. Top. Micro. Immunol.* 158:39-66, 1992; Jolly, D., *Cancer Gene Therapy* 1:51-64 1994). Se han diseñado vectores adenovirales con deleciones de diversas secuencias génicas adenovirales, tales como vectores pseudoadenovirales (PAV) y adenovirales parcialmente eliminados (llamados "DeAd"), para aprovechar las características deseables de los adenovirus que los convierten en un vehículo adecuado para el suministro de ácidos nucleicos a células receptoras.

En particular, los vectores pseudoadenovirales (PAV), también conocidos como 'adenovirus gutless' o mini-vectores adenovirales, son vectores adenovirales derivados del genoma de un adenovirus que contiene las secuencias nucleotídicas de acción *cis* mínimas necesarias para la replicación y empaquetado del genoma del vector y que pueden contener uno o más transgenes (Véase, la patente de Estados Unidos N° 5.882.877 que cubre los vectores pseudoadenovirales (PAV) y métodos para producir PAV). Los PAV se han diseñado para aprovechar las características deseables de los adenovirus que los convierten en un vehículo adecuado para el suministro de genes. Aunque los vectores adenovirales generalmente pueden portar insertos de hasta 8 kb de tamaño por la deleción de regiones que son prescindibles para el crecimiento viral, la capacidad de carga máxima puede conseguirse con el uso de vectores adenovirales que contienen deleciones de la mayoría de las secuencias codificantes virales, incluyendo PAV. Véase, la patente de Estados Unidos N° 5.882.877 de Gregory *et al.*; Kochanek *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5731-5736, 1996; Parks *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:13565-13570, 1996; Lieber *et al.*, *J. Virol.* 70:8944-8960, 1996; Fisher *et al.*, *Virology* 217:11-22, 1996; la patente de Estados Unidos N° 5.670.488; la publicación PCT N° WO96/33280, publicada el 24 de octubre de 1996; la publicación PCT N° WO96/40955, publicada el 19 de diciembre de 1996; la publicación PCT N° WO97/25446, publicada el 19 de julio de 1997; la publicación PCT N° WO95/29993, publicada el 9 de noviembre de 1995; la publicación PCT N° WO97/00326, publicada el 3 de enero de 1997; Morral *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 10:2709-2716, 1998. Dichos PAV, que pueden alojar hasta aproximadamente 36 kb de ácidos nucleico foráneo, son ventajosos porque la capacidad de carga del vector está optimizada, mientras que se reduce el potencia de respuestas inmunes del hospedador contra el vector o la generación de virus competentes para la replicación. Los vectores PAV contienen las secuencias de nucleótidos de la repetición terminal invertida (ITR) 5' y la ITR 3' que contienen el origen de replicación, y la secuencia de nucleótidos de acción *cis* necesaria para el empaquetado del genoma del PAV, y pueden alojar uno o más transgenes con elementos reguladores apropiados, por ejemplo, promotor, potenciadores, etc.

Otros, los vectores adenovirales parcialmente eliminados proporcionan un vector adenoviral parcialmente eliminado (llamado "DeAd") en el que la mayoría de los genes tempranos adenovirales necesarios para la replicación del virus se eliminan del vector y se colocan dentro del cromosoma de una célula productora bajo el control de un promotor condicional. Los genes adenovirales que se pueden eliminar que se pueden colocar en la célula productora pueden incluir E1A/E1B, E2, E4 (solamente ORF6 y ORF6/7 tienen que colocarse en la célula), pIX y pIVa2. También puede eliminarse E3 del vector, pero como no es necesario para la producción del vector, puede omitirse de la célula productora. Los genes tardíos adenovirales, normalmente bajo el control del promotor tardío principal (MLP), están presentes en el vector, pero el MLP puede remplazarse por un promotor condicional.

Los promotores condicionales adecuados para su uso en vectores DeAd y líneas celulares productoras incluyen aquellos con las siguientes características: baja expresión basal en estado no inducido, de modo que no se expresen genes adenovirales citotóxicos o citostáticos a niveles dañinos para la célula; y expresión de elevado nivel en estado inducido, de modo que se produzcan suficientes cantidades de proteínas virales para soportar la replicación y ensamblaje del vector. Los promotores condicionales preferidos adecuados para su uso en vectores DeAd y líneas celulares productoras incluyen el sistema de control génico del dimerizador, basado en los agentes inmunosupresores FK506 y rapamicina, el sistema de control génico de la ecdisona y el sistema de control génico de la tetraciclina. También puede ser útil en la presente descripción, incluyendo la presente invención, la tecnología GeneSwitch™ (Valentis, Inc., Woodlands, TX) descrita en Abruzzese *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 1999 10:1499-507. El sistema de expresión adenoviral parcialmente eliminado se describe adicionalmente en el documento WO99/57296.

El virus adeno-asociado (AAV) es un parvovirus ADN humano de cadena sencilla cuyo genoma tiene un tamaño de 4,6 kb. El genoma del AAV contiene dos genes principales: el gen rep, que codifica las proteínas rep (Rep 78, Rep 68, Rep 52, y Rep 40) y que están implicadas en la replicación, rescate, transcripción e integración de AAV; y el gen cap que codifica las proteínas cap que forman la partícula viral AAV. El AAV obtiene su dependencia en un adenovirus u otro virus auxiliar (por ejemplo, herpesvirus) para suministrar los productos génicos esenciales que permitan que el AAV experimente una infección productiva, es decir, se reproduzca por sí mismo en la célula hospedadora. En ausencia del virus auxiliar, el AAV se integra en forma de un provirus en el cromosoma de la célula hospedadora, hasta que se ve rescatado por superinfección de la célula hospedadora con un virus auxiliar, habitualmente un adenovirus (Muzyczka, *Curr. Top. Micor. Immunol.* 158:97-127, 1992).

El interés en AAV como vector de transferencia génica está provocado por varias características de su biología. En ambos extremos del genoma de AAV hay una secuencia de nucleótidos conocida como repetición terminal invertida (ITR), que contiene las secuencias de nucleótidos de acción *cis* necesarias para la replicación, rescate, empaquetado e integración del virus. La función de integración de la ITR mediada por la proteína rep en *trans* permite que el genoma de AAV se integre en un cromosoma celular después de la infección, en ausencia de virus auxiliar. Esta propiedad única del virus tiene relevancia para el uso de AAV en transferencia de genes, ya que permite la integración de un AAV recombinante que contenga un gen de interés en el genoma celular. Por lo tanto,

puede conseguirse la transformación genética estable, ideal para muchos de los objetivos de la transferencia de genes, mediante el uso de vectores rAAV. Además, el sitio de integración para el AAV está bien establecido y se ha localizado en el cromosoma 19 del ser humano (Kotin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:2211-2215, 1990). Esta predecibilidad del sitio de integración reduce el peligro de acontecimientos de inserción aleatoria en el genoma celular que pueden activar o inactivar genes del hospedador o interrumpir las secuencias codificantes, consecuencias que pueden limitar el uso de vectores con integración de AAV, la eliminación de este gen en el diseño de vectores rAAV puede provocar patrones de integración alterados que se han observado con vectores rAAV (Ponnazhagan *et al.*, *Hum Gene Ther.* 8:275-284, 1997).

Hay otras ventajas al uso de AAV para la transferencia de genes. El rango de hospedador de los AAV es amplio. Además, a diferencia de los retrovirus, los AAV pueden infectar células tanto quiescentes como en división. Además, los AAV no se han asociado con enfermedad humana, obviando muchas de las preocupaciones de han surgido con los vectores de transferencia de genes derivados de retrovirus.

Los enfoques convencionales a la generación de vectores rAAV recombinantes ha requerido la coordinación de una serie de acontecimientos intracelulares: la transfección de la célula hospedadora con un genoma de vector rAAV que contenga un transgén de interés flanqueado por las secuencias ITR de AAV, la transfección de la célula hospedadora por un plásmido que codifique los genes para las proteínas rep y cap de AAV que son necesarias en *trans*, y la infección de la célula transfectada con un virus auxiliar para suministrar las funciones auxiliares no AAV necesarias en *trans* (Muzyczka, N., *Curr. Top. Micor. Immunol.* 158:97-129, 1992). Las proteínas adenovirales (u otros virus auxiliares) activan la transcripción del gen rep de AAV, y las proteínas rep después pueden activar la transcripción de los genes cap de AAV. Las proteínas cap después utilizan las secuencias ITR para empaquetar el genoma del rAAV en una partícula viral rAAV. Por lo tanto, la eficacia del empaquetado está determinada, en parte, por la disponibilidad de cantidades adecuadas de las proteínas estructurales, así como la accesibilidad de cualquier secuencia de empaquetado de acción *cis* necesarias en el genoma del vector rAAV.

Los vectores retrovirales son una herramienta común para el suministro de genes (Miller, *Nature* (1992) 357:455-460). La capacidad de los vectores retrovirales de suministrar una única copia no ordenada del gen en un amplio intervalo de células somáticas de roedores, primates y seres humanos hace a los vectores retrovirales muy adecuados para transferir genes a una célula.

Los retrovirus son virus ARN en los que el genoma viral es ARN. Cuando se infecta una célula hospedadora con un retrovirus, el ARN genómico se transcribe de forma inversa en un intermedio de ADN que se integra de forma muy eficaz en el ADN cromosómico de las células infectadas. Este intermedio de ADN integrado se conoce como provirus. La transcripción del provirus y su ensamblaje en virus infecciosos sucede en presencia de un virus auxiliar apropiado o en una línea celular que contenga secuencias apropiadas que posibiliten la encapsidación sin producción simultánea de un virus auxiliar contaminante. No es necesario un virus auxiliar para la producción de retrovirus recombinante si se proporcionan las secuencias para la encapsidación por co-transfección con vectores apropiados.

El genoma retroviral y el ADN pro viral tienen tres genes: el gag, el pol, y el env, que están flanqueados por dos secuencias de repetición terminal larga (LTR). El gen gag codifica las proteínas estructurales internas (matriz, cápsida, y nucleocápsida); el gen pol codifica la ADN polimerasa dirigida por ARN (transcriptasa inversa) y el gen env codifica las glucoproteínas de la envuelta viral. Las LTR 5' y 3' sirven para promover la transcripción y la poliadenilación de los ARN de los viriones. La LTR contiene todas las demás secuencias de acción *cis* necesarias para la replicación viral. Los lentivirus tienen genes adicionales que incluyen vit, vpr, tat, rev, vpu, nef, y vpx (en VIH-1, VIH-2 y/o VIS). Adyacentes a la LTR 5' hay secuencias necesarias para la transcripción inversa del genoma (el sitio de unión del ARNt cebador) y para la encapsidación eficaz del ARN viral en partículas (el sitio Psi). Si las secuencias necesarias para la encapsidación (o empaquetado del ARN retroviral en viriones infecciosos) están ausentes en el genoma viral, el resultado es un defecto en *cis* que evita la encapsidación del ARN genómico. Sin embargo, el mutante resultante aún es capaz de dirigir la síntesis de todas las proteínas del virión.

Los lentivirus son retrovirus complejos que, además de los genes retrovirales comunes gag, pol y env, contienen otros genes con función reguladora o estructural. La mayor complejidad posibilita que los lentivirus modulen el ciclo vital de los mismos, como en el transcurso de la infección latente. Un lentivirus típico es el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el agente etiológico del SIDA. *In vivo*, el VIH puede infectar células diferenciadas de forma terminal que raramente se dividen, tales como linfocitos y macrófagos. *In vitro*, el VIH puede infectar cultivos primarios de macrófagos derivados de monocitos (MDM) así como células HeLa-Cd4 o linfoides T detenidas en el ciclo celular por tratamiento con afidicolina o irradiación gamma. La infección de las células depende del aporte nuclear activo de complejos de preintegración de VIH a través de los poros nucleares de las células diana. Eso sucede por la interacción de múltiples determinantes moleculares parcialmente redundantes en el complejo con la maquinaria de importación nuclear de la célula diana. Los determinantes identificados incluyen una señal de localización nuclear funcional (NLS) en la proteína de matriz gag (MA), la proteína asociada a viriones cariófila, vpr, y un resto de fosfotirosina C-terminal en la proteína MA gag. El uso de retrovirus para terapia génica se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 6.013.516; y la patente de Estados Unidos 5.994.136.

Otros métodos para suministrar ADN a las células no usan virus para el suministro. Por ejemplo, pueden usarse compuestos anfífilos catiónicos para suministrar el ácido nucleico de la presente descripción, por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención. Como los compuestos diseñados para facilitar el suministro intracelular de moléculas biológicamente activas deben interactuar con entornos tanto no polares como polares (en o sobre, por ejemplo, la membrana plasmática, fluidos tisulares, compartimentos dentro de la célula, y la propia molécula biológicamente activa), dichos compuestos se diseñan típicamente para que contengan dominios tanto polares como no polares. Los compuestos que tiene estos dos dominios pueden llamarse anfífilos, y muchos lípidos y lípidos sintéticos que se han descrito para su uso en la facilitación de dicho suministro intracelular (sean para aplicación *in vitro* o *in vivo*) cumplen esta definición. Una clase particularmente importante de dichos anfífilos es los anfífilos catiónicos. En general, los anfífilos catiónicos tienen grupos polares que son capaces de cargarse positivamente en

o aproximadamente a pH fisiológico, y esta propiedad se entiende que es importante en la técnica para definir cómo interaccionan los anfífilos con los muchos tipos de moléculas biológicamente activas (terapéuticas) incluyendo, por ejemplo, polinucleótidos cargados negativamente tales como ADN.

5 El uso de composiciones que comprenden compuestos anfífilos catiónicos para el suministro de genes se describe, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos 5.049.386; el documento US 5.279.833; el documento US 5.650.096; el documento US 5.747.471; el documento US 5.767.099; el documento US 5.910.487; el documento US 5.719.131; el documento US 5.840.710; el documento US 5.783.565; el documento US 5.925.628; el documento US 5.912.239; el documento US 5.942.634; el documento US 5.948.925; el documento US 6.022.874; el documento U.S. 5.994.317; el documento U.S. 5.861.397; el documento U.S. 5.952.916; el documento U.S. 5.948.767; el documento U.S. 5.939.401; y el documento U.S. 5.935.936.

10 Además, el ácido nucleico de la presente descripción, por ejemplo, el ácido nucleico de la presente invención puede suministrarse usando "ADN desnudo". Los métodos para suministrar una secuencia de ADN no integrante, no infecciosa que codifica un polipéptido o péptido deseado unida de forma funcional a un promotor, libre de asociación con proteínas que faciliten la transfección, partículas virales, formulaciones liposomales, lípidos cargados y agentes de precipitación de fosfato cálcico se describen en la patente de Estados Unidos 5.580.859; el documento U.S. 5.963.622; el documento U.S. 5.910.488.

También se ha informado de sistemas de transferencia de genes que combinan componentes virales y no virales. Cristiano *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:11548; Wu *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269:11542; Wagner *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:6099; Yoshimura *et al.* (1993) *J. Biol. Chem.* 268:2300; Curiel *et al.* (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8850; Kupfer *et al.* (1994) *Human Gene Ther.* 5:1437; y Gottschalk *et al.* (1994) *Gene Ther.* 1:185. En la mayoría de los casos, se han incorporado adenovirus en los sistemas de suministro de genes para sacar provecho de sus propiedades endosomolíticas. Las combinaciones presentadas de componentes virales y no virales generalmente implican unión covalente del adenovirus a un complejo de suministro de genes o co-internalización de adenovirus no unido con complejos de lípido catiónico:ADN.

25 Para el suministro de ADN y proteína al ojo, la administración típicamente será local. Esto tiene la ventaja de limitar la cantidad de ADN que tiene que administrar y de limitar los efectos secundarios sistémicos. Pueden usarse muchos modos posibles de suministro incluyendo, aunque sin limitación: administración tópica sobre la córnea por una pistola génica; inyección subconjuntival, inyección intracameral, mediante gotas oculares a la córnea, inyección al interior de la cámara anterior mediante el limbo temporal, inyección intraestromal, aplicación a la córnea combinada con pulsos eléctricos, inyección intracorneana, inyección subretiniana, inyección intravitreal, e inyección intraocular. Como alternativa, pueden transfectarse o transducirse células *ex vivo* y suministrarse por implante intraocular. Véase, Auricchio, *Mol. Ther.* 6: 490-494, 2002; Bennett, *Nature Med.* 2: 649-654, 1996; Borrás, *Experimental Eye Research* 76: 643-652, 2003; Chaum, *Survey of Ophthalmology* 47: 449-469, 2002; Campochiaro, *Expert Opinions in Biological Therapy* 2: 537-544 (2002); Lai, *Gene Therapy* 9: 804 813, 2002; Pleyer, *Progress in Retinal and Eye Research*, 22: 277-293, 2003.

30 Pueden ensayarse los efectos de diversos agentes terapéuticos y administraciones propuestas en modelos animales adecuados para enfermedades particulares. Por ejemplo, la retinopatía del prematuro puede ensayarse en un modelo de retinopatía inducida por oxígeno en ratones como se describe en Smith, *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 35: 101-111, 1994. Puede usarse neovascularización coroidal inducida por láser en ratones como modelo para neovascularización coroidal humana (CNV) que sucede en enfermedades tales como degeneración macular relacionada con la edad. Tobe, *American Journal of Pathology* 153: 1641-1646, 1998. Se han desarrollado otros modelos de CNV en primates, ratas, cerdos enanos, y conejos. Se han desarrollado modelos de ratón de degeneración macular relacionada con la edad en ratones genéticamente deficientes. Los ratones deficientes en la proteína-1 quimioatrayente de monocitos o el receptor-2 de quimioquina C-C desarrollan características de degeneración macular relacionada con la edad. Ambati, *Nature Med.* 9: 1390-1397, 2003.

45 Aunque la invención se ha descrito con respecto a ejemplos específicos incluyendo los modos actualmente preferidos de realizar la invención, los especialistas en la técnica apreciarán que existen numerosas variaciones y permutaciones de los sistemas y técnicas descritas anteriormente que están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

Se generaron dos construcciones: la primera, D2-9Gly-Fc, que contenía un enlazador de 9 unidades de poliglicina (9Gly) y la segundo, D2-Fc, con la misma secuencia excepto el enlazador 9Gly (Fig. 1).

55 Se analizaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas D2-9Gly-Fc y D2-Fc usando el Protein Analysis Toolbox del programa de análisis de secuencias Mac Vector 6.5.1. (IBI, New Haven, CT). El enlazador de 9 unidades de poliglicina en la secuencia de D2-9Gly-Fc se identificó como una región con mayor flexibilidad promedio por el método de predicción de flexibilidad de Karpus y Schultz (1985) *Naturwiss*, 72: 212-213. No se detectó dicha región en la secuencia de D2-Fc (Fig. 1).

Ejemplo 2

60 Se ensayó un dominio tipo Ig 2 Flt-1 conectado a la región Fc de IgG1 por un enlazador de 9 unidades de poliglicina (D2-9Gly-Fc) flexible. La proteína de fusión D2-9Gly-Fc es capaz de unirse de forma eficaz a VEGF y de inhibir la proliferación de células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) dependiente de VEGF. Véase la Fig. 2. En contraste, cuando se une el dominio tipo Ig 2 Flt-1 directamente a la cadena pesada de IgG1 (Fc) para formar D2-Fc, se observó una unión solamente mínima a VEGF. Véase la Fig. 2. Tanto la dimerización mediante el Fc de IgG1 como la inserción de un enlazador flexible parecen facilitar la unión de VEGF al dominio 2 de Flt-1. Se confirmó la

presencia de formas diméricas tanto en D2-9Gly-Fc como en D2-Fc por análisis de transferencia de Western. Véase la Fig. 3.

Ejemplo 3

5 Se administra una inyección intravitreal de vector AAV (de 1×10^8 a 1×10^9 partículas en un volumen de 0,0005 ml) a ratones C57BL/6 recién nacidos (P0) o de 1 día de edad (P1). Se induce neovascularización retiniana (NV) en los ratones C57BL/6 exponiendo crías P7 y sus hembras de lactación a hiperoxia durante 5 días. Las crías se devolvieron a aire ambiental en P12 y se sacrificaron en P17 (momento del pico de NV). (Smith LEH, Weslowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan y D'Amore PA. Oxygen-Induced Retinopathy in the Mouse. *Invest Opth Vis Sci*. 1994; 35:101-111.) Se seccionaron de forma transversal en serie ojos completos impregnados en parafina a intervalos de 5 micrómetros. El grado de NV se determina contando la cantidad de núcleos de células endoteliales internos a la membrana de limitación interna en secciones tomadas cada 100 micrómetros.

10 Se comparan cohortes de animales tratados con los vectores AAV que codifican los agentes anti-angiogénicos con cohortes tratadas con vectores que codifican transgenes irrelevantes o con vectores que no codifican un transgén. La cantidad promedio de núcleos de células endoteliales en cada ojo tratado se compara con el ojo similar no tratado de cada animal.

Ejemplo 4

Generación de D2-9Gly-Ex3/CH3

20 Se ha demostrado que el dominio 2 de Flt-1 es esencial para la unión de VEGF₁₆₅. Sin embargo, se demostró que el dominio 2 de Flt-1 solo era incapaz de unirse a VEGF A. (Davis-Smyth et al., 1996.) VEGF A, cuando está presente en forma de dímero, se une a Flt-1 a través de restos ácidos (aminoácidos 63-67 de la proteína madura) que permite un posible mecanismo para la dimerización inducida por ligando del receptor (Keyt et al, 1996).

25 Por lo tanto, se usó una dimerización del dominio 2 de Flt-1 como estrategia para restaurar la unión del dominio 2 de Flt-1 a VEGF A. Puede usarse la fusión con un fragmento de la cadena pesada de IgG para la dimerización de proteínas (Davis-Smyth et al., 1996). Aquí se demuestra que los aminoácidos 75-88 (es decir, PSCVPLMRGGCCN; SEC ID N° 13) de VEGF A (SEC ID N° 12) aumentan la actividad biológica de las proteínas híbridas sFlt-1.

30 Inicialmente, se diseñaron tres proteínas híbridas: D2-9Gly-Fc, D2-Fc y D2-9Gly-Ex3/CH3 (Fig. 4). Las tres proteínas híbridas contienen el mismo dominio D2 de Flt-1 que D2-9Gly-Fc. No se observó unión de VEGF con D2-Fc, que no contiene el enlazador de 9 unidades de poliglicina (9Gly). La tercera proteína, D2-9Gly-Ex3/CH3, contiene el enlazador de 9 unidades de poliglicina (9Gly) y el dominio de multimerización de VEGF (aminoácidos PSCVPLMRGGCCN; SEC ID N° 13; VEGF Ex3), pero también contiene la región CH3 de Fc de cadena pesada de IgG1 humana (aminoácidos 371-477 de la SEC ID N° 10).

35 La proteína D2-Fc no mostró actividad inhibitoria eficaz en el ensayo de proliferación de HUVEC (Fig. 5) y por implicación no se unía a VEGF₁₆₅ de forma eficaz. Sin embargo, la tercera proteína híbrida, D2-9Gly-Ex3/CH3, que comprende el dominio 2 de Flt-1 fusionado con la región CH3 mediante tanto el enlazador 9Gly como la región de dimerización de VEGF₁₆₅ (Ex3), mostraba actividad inhibitoria en un ensayo de proliferación de HUVEC dependiente de VEGF (Fig. 5). Esto implica que esta proteína híbrida se une a VEGF₁₆₅ de forma eficaz.

Ejemplo 5

Uso del enlazador (Gly₄Ser)₃ en la construcción Flt-1 D2

40 El uso de varios enlazadores de poliglicina se ha descrito previamente para la mejora de las características proteicas (Mouz et al., 1996; Qiu et al., 1998). Para la siguiente construcción se ha usado otro tipo de enlazador, el oligómero de 15 unidades (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ (Huston et al., 1988). Se generó la proteína D2-(Gly₄Ser)₃-Fc y contiene el dominio 2 de Flt-1, el enlazador (Gly₄Ser)₃ y la región Fc de la cadena pesada de IgG1 humana.

45 D2-(Gly₄Ser)₃-Fc se caracterizó adicionalmente en un ensayo de proliferación de HUVEC. La actividad biológica de D2-(Gly₄Ser)₃-Fc medida por la inhibición de la proliferación de HUVEC fue similar a la de D2-9Gly-Fc y D2-9Gly-Ex3/CH3 (Fig. 6).

La construcción D2-(Gly₄Ser)₃-Fc se caracterizó adicionalmente por transferencia de Western y se comparó con D2-9Gly-Fc (Fig.9). Ambas construcciones están presentes principalmente en una forma dimérica y se detectaron formas monoméricas después de la separación de muestras reducidas.

Ejemplo 6

Papel de 9Gly o VEGF Ex3 en construcciones Flt-1 (D2)

55 Para investigar el papel del enlazador 9Gly o la secuencia de dimerización de VEGF Ex3 sobre la unión del receptor soluble VEGF, se generaron otras tres construcciones: D2-9Gly-CH3, D2-CH3 y D2-Ex3/CH3 (Fig. 8). Las tres construcciones se generaron y como todas las construcciones previas también se pusieron bajo el control del promotor CMV. Su actividad de bloqueo de VEGF se ensayó en el ensayo de proliferación de HUVEC (Fig. 9).

El ensayo de proliferación de HUVEC de proteínas que contienen la región CH3 de IgG1 ha demostrado que D2-9Gly-CH3 (sin Ex3) y la proteína D2-Ex3/CH3 (sin enlazador 9Gly) tenían potencia de bloqueo de VEGF similar en comparación con la proteína D2-9Gly-Ex3/CH3 parental. Sin embargo, parece que la proteína D2-CH3 es el inhibidor más débil de VEGF entre todas ellas (Fig. 9).

Los datos de ELISA de Flt-1 de medios condiciones de células 293 transfectadas tienen niveles de Flt-1 similares para D2-9Gly-Ex3/CH3, D2-9Gly-CH3 y D2-Ex3/CH3 y D2-CH3 (70-90 ng/ml) y un poco mayores (~150 ng/ml) para la forma menos activa de D2-CH3. La transferencia de Western de las construcciones D2-9Gly-CH3 y D2-CH3 (Fig. 10) demuestra un predominio de formas diméricas en condiciones no reducidas.

5 Ejemplo 7

D2-9Gly-Fc se une a VEGF mejor que todas las construcciones

El ensayo de unión de VEGF permite comparar las afinidades de unión relativas a VEGF de estos receptores de VEGF solubles en un sistema libre de células.

- 10 En resumen, se diluyeron en serie medios condicionados que contenían concentraciones conocidas de receptor soluble (que variaban en las concentraciones de 0,29 - 150 pM) y se mezclaron con VEGF 10 pM. La cantidad de VEGF no unido se midió después por ELISA. D2-9Gly-Fc se une a VEGF con mayor afinidad en las concentraciones de receptor de 0,001 a ~0,2 pM que todas las demás construcciones. D2-CH3 tiene la afinidad más baja para unirse a VEGF (Fig. 11).

Referencias

- 15 Davis-Smyth, et al., *EMBO J.*, 15,1996, 4919
 Huston, J. S., et al. (1991) *Methods Enzymol.* **203**, 46-88
 Huston, J. S., et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5879-5883.
 Johnson, S., et al. (1991) *Methods Enzymol.* **203**, 88-98
 Karpus, P. A., et al. (1985) *Naturwiss.*, **72**, 212-213.
 20 Keyt, B. A., et al. (1996) *J. Biol. Chem.* 271: 5638 - 5646.
 Kortt, A. A., et al. (1997) *Protein Engng*, **10**, 423-433.
 Lee, Y-L., et al. (1998) *Human Gene Therapy*, **9**, 457-465
 Mouz N., et al. (1996) *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **93**, 9414-9419.
 Nielsen, et al. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 1
 25 Qiu, H., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 11173-11176.

Tabla de secuencias

SEC ID N°	Nombre del clon	Longitud	Tipo
1	FLT1D29GLYFC	1077	DNA
2	FLT1D29GLYFC	358	Proteína
3	FLT1D2DEL9GLYFC	1050	DNA
4	FLT1D2DEL9GLYFC	349	Proteína
5	FLT1D29GLYEX3	426	DNA
6	FLT1D29GLYEX3	141	Proteína
7	FLT1D29GLYEX3CH3	744	DNA
8	FLT1D29GLYEX3CH3	247	Proteína
9	IgG1 HEAVY	1434	DNA
10	IgG1 HEAVY	477	Proteína
11	VEGF	648	DNA
12	VEGF	215	Proteína
13	VEGF exón 3 (ex3)	14	Proteína
14	FLT-1	5777	DNA
15	FLT-1	1338	Proteína
16	KDR	5830	DNA
17	KDR	1356	Proteína
18	D2-CH3	675	DNA
19	D2-CH3	224	Proteína
20	D2-EX3-CH3	717	DNA
21	D2-EX3-CH3	238	Proteína
22	D2-9GLY-CH3	702	DNA
23	D2-9GLY-CH3	233	Proteína
24	D2(G4S)3-Fc	1095	DNA
25	D2(G4S)3-Fc	364	Proteína
26	enlazador aleatorio	9	Proteína
27	enlazador	9	Proteína
28	enlazador	9	Proteína
29	enlazador	9	Proteína
30	enlazador	9	Proteína
31	enlazador	7	Proteína
32	enlazador	13	Proteína
33	enlazador	9	Proteína
34	enlazador	23	Proteína

A continuación se describen realizaciones preferidas de la presente descripción y se refieren como realizaciones E1 to E71.

5 E1. Una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en donde

X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento; e

Y consiste esencialmente en un polipéptido de 5 a 25 restos aminoacídicos, y

Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG

- 5 E2. La proteína de fusión de E1 en donde X comprende un receptor extracelular y dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en un receptor tirosina quinasa y un receptor serina treonina quinasa.
- E3. La proteína de fusión de E1 en donde X comprende un receptor extracelular y dicho receptor es un receptor del VEGF.
- E4. La proteína de fusión de E1 en donde X es el dominio 2 de tipo IgG de VEGF-R1 (FLT-1).
- 10 E5. La proteína de fusión de E1 en donde el polipéptido Y es flexible.
- E6. La proteína de fusión de E1 en donde el polipéptido Y se selecciona del grupo que consiste en gly₉ (SEQ ID NO: 27), glu₉ (SEQ ID NO: 28), ser₉ (SEQ ID NO: 29), gly₅cyspro₂cys (SEQ ID NO: 30), (gly₄ser)₃ (SEQ ID NO: 31), SerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEQ ID NO: 32), Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn (SEQ ID NO: 13), Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys (SEQ ID NO: 26), y
- 15 Gly₉ProSerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEQ ID NO: 34).
- E7. La proteína de fusión de E1 en donde Z es una región CH3 de IgG1.
- E8. La proteína de fusión de E7 en donde Z es una región CH3 de IgG2.
- E9. Una composición que comprende la proteína de fusión de E1 que además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- 20 E10. La composición de E9 en donde dicha composición es una formulación líquida.
- E11. La composición de E9 en donde dicha composición es una formulación liofilizada.
- E12. Una composición que comprende una o más proteínas de fusión de E1, en donde dicha composición comprende multímeros de dichas proteínas de fusión.
- 25 E13. La composición de E12, en donde dicha composición consiste esencialmente en una sola especie de proteína de fusión que forma homomultímeros.
- E14. La composición de E12, en donde dicha composición consiste esencialmente en proteínas de fusión, en donde los restos X en dichas proteínas de fusión en la composición son heterogéneos.
- E15. La composición de E12 en donde el resto X es un receptor extracelular, y dicho receptor se selecciona del grupo que consiste en un receptor tirosina quinasa y un receptor serina treonina quinasa.
- 30 E16. La composición de E12 en donde el resto X es un receptor extracelular, y dicho receptor es un receptor del VEGF o una porción del mismo.
- E17. La composición de E12 en donde el resto X es el dominio 2 de tipo IgG de VEGF-R1 (FLT-1).
- E18. La composición de E12 en donde Y es un polipéptido flexible.
- 35 E19. La composición de E12 en donde Y es un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en gly₉ (SEQ ID NO: 27), glu₉ (SEQ ID NO: 28), ser₉ (SEQ ID NO: 29), gly₅cyspro₂cys (SEQ ID NO: 30), (gly₄ser)₃ (SEQ ID NO: 31), SerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEQ ID NO: 32), Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn (SEQ ID NO: 13), Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys (SEQ ID NO: 26), y Gly₉ProSerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEQ ID NO: 34).
- E20. La composición de E12 en donde Z es una región CH3 y dicha región es una región CH3 de IgG1.
- 40 E21. La composición de E12 que además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- E22. La composición de E21 en donde dicha composición es una formulación líquida.
- E23. La composición de E21 en donde dicha composición es una formulación liofilizada.
- E24. Un polipéptido de fórmula X-Y-Z, en donde
- 45 X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento;
- Y consiste esencialmente en un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoacídicos; y
- Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG.

- E25. El polipéptido de E24 en donde el resto enlazador es un oligómero que tiene 10-100 restos monómeros de etilenglicol
- E26. Una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en donde
- 5 X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento; e
- Y consiste esencialmente en un polipéptido de 5 a 25 restos aminoacídicos, y
- Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo.
- E27. La proteína de fusión de E26, en donde el Fc es un Fc de IgG.
- E28. La proteína de fusión de E27, en donde el Fc de IgG es Fc de IgG1.
- 10 E29. Una composición que comprende la proteína de fusión de E26 que además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- E30. La composición de E29 en donde Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo que es un Fc de IgG.
- E31. La composición de E29 en donde Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo que es un Fc de IgG1.
- E32. Una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en donde
- 15 X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento; e
- Y consiste esencialmente en un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoacídicos, y
- Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo.
- 20 E33. La proteína de fusión de E32, en donde el Fc es un Fc de IgG.
- E34. La proteína de fusión de E33, en donde el Fc de IgG es Fc de IgG1.
- E35. La proteína de fusión de E32 en donde el resto enlazador es un oligómero que tiene 10-100 restos monómeros de etilenglicol.
- 25 E36. Una composición que comprende la proteína de fusión de E32 que además comprende uno o más excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables.
- E37. La composición de E36 en donde Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo que es un Fc de IgG.
- E38. La composición de E36 en donde Z es una porción Fc de una molécula de anticuerpo que es un Fc de IgG1.
- E39. Un método para multimerizar un polipéptido X que comprende:
- unir un polipéptido X a un polipéptido Z mediante un polipéptido Y para formar un polipéptido XYZ, en donde
- 30 X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento Y consiste esencialmente en un polipéptido de 5 a 25 restos aminoacídicos, y
- Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG;
- con lo que se multimeriza el polipéptido XYZ.
- 35 E40. El método de E39 en donde la etapa de unión comprende construir una molécula de ácido nucleico que codifica cada uno de X, Y, y Z como un solo marco de lectura abierto, en donde dicho polipéptido XYZ se expresa a partir de la construcción de ácido nucleico en una célula hospedante.
- E41. Un método para multimerizar un polipéptido X que comprende:
- unir un polipéptido X a un polipéptido Z mediante un polipéptido Y para formar un polipéptido XYZ, en donde
- 40 X comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en un receptor extracelular, una región variable de anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, y un factor de crecimiento;
- Y consiste esencialmente en un resto enlazador que proporciona la separación espacial de 5-25 restos aminoacídicos, y
- Z es una región CH3 de una molécula de cadena pesada de IgG;
- 45 con lo que se multimeriza el polipéptido XYZ.

- E42. El método de E41 en donde el resto enlazador consiste esencialmente en un oligómero de 10-100 restos monómeros de etilenglicol.
- E43. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según E1.
- E44. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión según E26.
- 5 E45. El ácido nucleico de E43 o 44 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1).
- E46. El ácido nucleico de E43 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1) y la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 21, y 23.
- E47. El ácido nucleico de E44 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1) y la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 25.
- 10 E48. La proteína de fusión de E1 o 26 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1).
- E49. La proteína de fusión de E1 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1) y la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 8, 21, y 23.
- E50. La proteína de fusión de E26 en donde X es el dominio 2 de tipo Ig de VEGF-R1 (Flt-1) y la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2 y 25.
- 15 E51. Una célula de mamífero que comprende el ácido nucleico de E43 o 44.
- E52. La célula de mamífero de E51 que es una célula humana.
- E53. La célula de mamífero de E52 que se selecciona del grupo que consiste en un fibroblasto, un hepatocito, una célula endotelial, un queratinocito, una célula hematopoyética, un sinoviocito, una célula epitelial, una célula retiniana, y una célula madre.
- 20 E54. Un método *in vitro* que comprende:
 suministrar el ácido nucleico de E43 o 44 a una célula aislada de mamífero para formar una célula que expresa dicha proteína de fusión.
- E55. El método de E54 en donde la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 8, 21, 23, y 25.
- 25 E56. El método de E54 que comprende además:
 suministrar la célula que expresa dicha proteína de fusión a un mamífero.
- E57. Un método que comprende:
 suministrar la célula de mamífero de E51 a un mamífero.
- E58. Un método que comprende:
- 30 suministrar el ácido nucleico de E43 o 44 a un mamífero, con lo que dicha proteína de fusión es expresada en el mamífero.
- E59. El método de E58 en donde la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 8, 21, 23, y 25.
- 35 E60. El método de E57 en donde el mamífero tiene degeneración macular húmeda relacionada con la edad o retinopatía diabética proliferativa.
- E61. El método de E58 en donde el mamífero tiene cáncer.
- E62. El método de E58 en donde el mamífero tiene artritis reumatoide.
- E63. El método de E58 en donde el mamífero tiene asma.
- E64. El método de E58 en donde el mamífero tiene osteoartritis.
- 40 E65. Un método que comprende:
 suministrar la proteína de fusión de E1 o 26 a un mamífero.
- E66. El método de E65 en donde el mamífero tiene degeneración macular húmeda relacionada con la edad o retinopatía diabética proliferativa.
- E67. El método de E65 en donde el mamífero tiene cáncer.
- 45 E68. El método de E65 en donde el mamífero tiene artritis reumatoide.
- E69. El método de E65 en donde el mamífero tiene asma.

E70. El método de E65 en donde el mamífero tiene osteoartritis.

E71. El método de E65 en donde la proteína de fusión comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2, 8, 21, 23, y 25.

5 **Listado de secuencias**

<110> Genzyme Corporation

<120> CONSTRUCCIONES MULTIMÉRICAS

<130> P30465EP-PCT

<140> EP05810409.2

10 <141> 2005-09-13

<150> 60/658209

<151> 04-03-2005

<150> 60/608887

<151> 13-09-2004

15 <160> 34

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

<210> 1

<211> 1077

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 1

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcg	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagacctt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcatac	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccggtgga	360
ggtggaggtg	gagggtgagg	tcctaaatct	tgtgacaaaa	ctcacacatg	cccaccgtgc	420
ccagcacctg	aactcctggg	gggaccgtca	gtcttcctct	tcccccaaaa	acccaaggac	480
accctcatga	tctcccggac	ccctgaggtc	acatgctgtg	tgggtggacgt	gagccacgaa	540
gaccctgagg	tcaagttcaa	ctgggtacgtg	gacggcgtgg	aggtgcataa	tgccaagaca	600
aagccgcggg	aggagcagta	caacagcacg	taccgtgtgg	tcagcgtcct	caccgtcctg	660
caccaggact	ggctgaatgg	caaggagtac	aagtgcaagg	tctccaacaa	agccctcca	720
gccccatcg	agaaaacat	ctccaaagcc	aaagggcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	780
accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	840
aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgaggaga	gcaatgggca	gccggagaac	900
aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	960
ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	1020
gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaatag	1077

25 <210> 2

<211> 358

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 2

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

<210> 3

5 <211> 1050

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

10 <400> 3

ES 2 407 859 T3

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcg	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcataatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtcg	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccctaaa	360
tcttgtgaca	aaactcacac	atgcccaccg	tgcccagcac	ctgaactcct	ggggggaccg	420
tcagtcttcc	tcttcccccc	aaaacccaag	gacaccctca	tgatctcccg	gaccctgag	480
gtcacatgcg	tggtggtgga	cgtgagccac	gaagaccctg	aggtcaagtt	caactggtac	540
gtggacggcg	tggaggtgca	taatgccaag	acaaagccgc	gggaggagca	gtacaacagc	600
acgtaccgtg	tggtcagcgt	cctcaccgtc	ctgcaccagg	actggctgaa	tggcaaggag	660
tacaagtgca	aggtctccaa	caaagccctc	ccagccccca	tcgagaaaac	catctccaaa	720
gccaaagggc	agccccgaga	accacaggtg	tacaccctgc	ccccatcccg	ggatgagctg	780
accaagaacc	aggtcagcct	gacctgcctg	gtcaaaggct	tctatcccag	cgacatcgcc	840
gtggagtggg	agagcaatgg	gcagccggag	aacaactaca	agaccacgcc	tcccgtgctg	900
gactccgacg	gctccttctt	cctctacagc	aagctcaccg	tggacaagag	caggtggcag	960
caggggaacg	tcttctcatg	ctccgtgatg	catgaggctc	tgacacaacca	ctacacgcag	1020
aagagcctct	ccctgtctcc	gggtaaatag				1050

<210> 4

<211> 349

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 4

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

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 340 345

<210> 5

<211> 426

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 5

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcgc	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	tccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcatac	aaatgcaacg	tacaaaagaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccggtgga	360
ggtggagggtg	gaggtggagg	tccttcctgt	gtgccctga	tgcgatgcgg	gggctgctgc	420
aattag						426

10

<210> 6

ES 2 407 859 T3

<211> 141

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 6

```

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

<210> 7

<211> 744

10 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 7

```

15 atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc      60
   acaggatctg gtagacctt cgtagagatg tacagtgaat tccccgaaat tatacacatg      120

actgaaggaa gggagctcgt cattccctgc cgggttacgt cacctaacat cactgttact      180
ttaaaaaagt ttccacttga cactttgatc cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt      240
agaaagggct tcatcatac aaatgcaacg tacaagaaa tagggcttct gacctgtgaa      300
gcaacagtca atgggcattt gtataagaca aactatctca cacatcgaca aaccggtgga      360
ggtggaggtg gaggtggagg tccttcctgt gtgcccctga tgcgatgctg gggctgctgc      420
aatcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgggatga gctgaccaag      480
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat gcctgtggag      540
tggaagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgtg gctggactcc      600
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa atag                                     744
    
```

<210> 8

<211> 247

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 8

ES 2 407 859 T3

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

<210> 9

<211> 1434

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

atggagtttg ggctgagctg ggttttcctc gttgctcttt taagagggtg ccagtgctag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcgtg gtccagcctg ggaggtcctt gagactctcc 120

tgtgcagcgt ctggattcac cttcagtaat tatggcatgc actgggtccg ccaggctcca 180
 ggcaaggggc tggagtgggt ggcagctata tggatgatg gaagtaataa atactatgca 240
 gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gttgtatag 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt attgtgagag agagggctcg 360
 tgggtacgat atactacggt gactactatc ggatactact ttgactactg gggccagggg 420
 accctggta cctgtctctc agcctccacc aagggcccat cgttctccc cctggcacc 480
 tcctccaaga gcacctctgg gggcacagcg gccctgggct gcctgggtaa ggactactc 540
 cccgaaccgg tgacgggtgc gtggaactca ggcgccctga ccagcggcgt gcacacctc 600
 cccgtgtcc tacagtctc aggactctac tccctcagca gcgtgggtgac cgtgccctcc 660
 agcagcttg gcaaccagac ctacatctgc aacgtgaatc acaagcccag caacaccaag 720
 gtggacaaga gagttgagcc caaatcttgt gacaaaactc acacatgccc accgtgccc 780
 gcacctgaac tcctgggggg accgtcagtc ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 840
 ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac 900
 cctgaggta agttcaactg gtacgtggac ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag 960
 ccgctggagg agcagtacaa cagcacgtac cgtgtgggtc gcgtctcac cgtcctgcac 1020
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggctc ccaacaaagc cctcccagcc 1080
 cccatcgaga aaacctctc caaagccaaa gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc 1140
 ctccccat cccgggagga gatgaccaag aaccaggcca gcctgacctg cctggtcaaa 1200
 ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac 1260
 tacaagacca cgctcccgt gctggactcc gacggctcct tcttctcta tagcaagctc 1320
 accgtggaca agagcagggt gcagcagggg aacgtcttct catgctccgt gatgatgag 1380
 gctctgcaca accactacac gcagaagagc ctctccctgt ccccggttaa atga 1434

<210> 10

<211> 477

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

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

5

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 275 280 285
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 290 295 300
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 305 310 315 320
 Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
 325 330 335
 Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
 340 345 350
 Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
 355 360 365
 Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
 370 375 380
 Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
 385 390 395 400
 Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 405 410 415
 Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
 420 425 430
 Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 435 440 445
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
 450 455 460
 His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

ES 2 407 859 T3

<210> 11

<211> 648

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5 <400> 11

atgaactttc	tgctgtcttg	ggtgcattgg	agccttgcct	tgctgtctta	cctccacat	60
gccaagtggg	cccaggctgc	acccatggca	gaaggaggag	ggcagaatca	tcacgaagtg	120
gtgaagttca	tgatgtctta	tcagcgcagc	tactgccatc	caatcgagac	cctggtggac	180
atcttcagg	agtaccctga	tgagatcgag	tacatcttca	agccatcctg	tgtgcccctg	240
atgcatgacg	gggctgctg	caatgacgag	ggcctggagt	gtgtgccac	tgaggagtcc	300
aacatcacca	tgcagattat	gcggatcaaa	cctcaccaag	gccagcacat	aggagagatg	360
agcttcctac	agcacaacaa	atgtgaatgc	agaccaaaga	aagatagagc	aagacaagaa	420
aaaaaatcag	ttcgaggaaa	gggaaagggg	caaaaacgaa	agcgcaagaa	atcccgggat	480
aagtcctgga	gcgttcctg	tgggccttgc	tcagagcgga	gaaagcattt	gtttgtacaa	540
gatccgcaga	cgtgtaaata	ttcctgcaaa	aacacagact	cgcgttgcaa	ggcggaggag	600
cttgagttaa	acgaacgtac	ttgcagatgt	gacaagccga	ggcgggtga		648

<210> 12

<211> 215

<212> PRT

10 <213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13

15 <211> 14

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

ES 2 407 859 T3

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
 1 5 10

<210> 14

<211> 5777

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 14

```

gCGGacactc ctctcggtc cccccggca gCGGgGcgG ctCGgagcGg gctccggggc 60
tcgggtgCag cggccagcGg gcctggcggc gaggattacc cggggaagtG gttgtctcct 120
ggctggagcc Gcgagacggg cGctcagggc GcggggccGg cggggcgaa cgagaggacg 180
gactctggcG gccgggtcgt tggccggggg agcGcgggca cggggcgagc aggccgcgtc 240
gcgctcacca tggtcagctA ctgggacacc ggggtcctGc tGtgcGcgtc gctcagctgt 300
ctgcttctca caggatctag ttcaggttca aaattaaaag atcctgaact gagtttaaaa 360
ggcaccCagc acatcatGca agcaggccag aCactGcatc tccaatGcag gggggaagca 420
gccataaaat ggtctttGcc tGaaatggTg agtaaggaaa GcGaaaggct gagcataact 480
aaatctGcct gtGgaagaaa tggcaaaaca ttctGcagta ctttaacctt gaacacagct 540
caagcaaacC acactggctt ctacagctGc aaatatctag ctgtacctac ttcaaagaag 600
aaggaaacag aatctGcaat ctatatattt attagtGata caggtagacc tttcGtagag 660
atgtacagTg aaatccccga aattatacac atgactGaaG gaagggagct cgtcattccc 720
tgccgggtta cgtcacctaa catcactgtt actttaaaaa agtttccact tgacactttg 780
atccctGatg gaaaacGcat aatctgggac agtagaaagg gcttcatcat atcaaatGca 840
acgtacaaag aaatagggct tctgacctgt gaagcaacag tcaatgggca tttgtataag 900
acaaactatc tcacacatcG acaaaccaat acaatcatag atgtccaaat aagcacacca 960
cgcccagTca aattacttag aggccatact cttgtcctca attgtactGc taccactccc 1020
ttgaacacga gagttcaaat gacctggagt taccctgatg aaaaaataa gagagcttcc 1080
gtaaggcgac gaattgacca aagcaattcc catGccaaca tattctacag tGttcttact 1140
attgacaaaa tgcagaacaa agacaaagga ctttatactt gtcgtgtaag gagtggacca 1200
tcattcaaat ctgttaacac ctCagTgcat atatatgata aagcattcat cactgtgaaa 1260
catcGaaaac agcaggTgct tGaaaccgta gctggcaagc ggtcttaccg gctctctatg 1320
aaagtgaagg catttccctc gccggaagtT gtatggTtaa aagatgggtt acctGcgact 1380
gagaaatctg ctGctattt gactcgtggc tactcgttaa ttatcaagga cgtaactgaa 1440
gaggatGcag ggaattatac aatcttGctg agcataaaac agtcaaatgt gtttaaaaac 1500
ctcactGcca ctctaattgt caatgtgaaa ccccagattt acgaaaaggc cgtgtcatcG 1560
tttccagacc cggctctcta cccactgggc agcagacaaa tcctgacttG taccgcatat 1620
ggtatccctc aacctacaat caagtggTtc tggcaccctt gtaaccataa tcattccgaa 1680
gcaaggTgtg acttttGttc caataatgaa gagtccTtta tcctggatGc tgacagcaac 1740
atgggaaaca gaattgagag catcactcag cGcatggcaa taatagaagg aaagaataag 1800
atggctagca ctttggtTgt ggctgactct agaatttctg gaatctacat ttgcatagct 1860

```

tccaataaag	ttgggactgt	gggaagaaac	ataagctttt	atatacacaga	tgtgccaaat	1920
gggtttcatg	ttaacttggg	aaaaatgccg	acggaaggag	aggacctgaa	actgtccttg	1980
acagttaaca	agttcttata	cagagacggt	acttggattt	tactgctggac	agttaataac	2040
agaacaatgc	actacagtat	tagcaagcaa	aaaatggcca	tcactaagga	gactcctac	2100
actcttaatc	ttaccatcat	gaatgtttcc	ctgcaagatt	caggcaccta	tgcttcgaga	2160
gccaggaatg	tatacacagg	ggaagaaatc	ctccagaaga	aagaaattac	aatcagagat	2220
caggaagcac	catacctcct	gcgaaacctc	agtgatcaca	cagtggccat	cagcagttcc	2280
accacttag	actgtcatgc	taatgggtgc	cccagaccctc	agatcacttg	gtttaaaaac	2340
aaccacaaaa	tacaacaaga	gcctggaatt	atthttaggac	caggaagcag	cacgctgttt	2400
attgaaagag	tcacagaaga	ggatgaaggt	gtctatcact	gcaaagccac	caaccagaag	2460
ggctctgtgg	aaagttcagc	ataccctcact	gttcaaggaa	cctcggacaa	gtctaattctg	2520
gagctgatca	ctctaacatg	cacctgtgtg	gctgcgactc	tcttctggct	cctattaacc	2580
ctccttatcc	gaaaaatgaa	aaggtcctct	tctgaaataa	agactgacta	cctatcaatt	2640
ataatggacc	cagatgaagt	tcctttggat	gagcagtggtg	agcggctccc	ttatgatgcc	2700
agcaagtggg	agttttgccg	ggagagactt	aaactgggca	aatcacttgg	aagaggggct	2760
tttggaaaag	tggttcaagc	atcagcattt	ggcattaaga	aatcacctac	gtgcccggact	2820
gtggctgtga	aaatgctgaa	agagggggcc	acggccagcg	agtacaaagc	tctgatgact	2880
gagctaaaaa	tcttgaccca	cattgccac	catctgaacg	tggttaacct	gctgggagcc	2940
tgaccaagc	aaggagggcc	tctgatgggtg	attgttgaat	actgcaaata	tggaatctc	3000
tccaactacc	tcaagagcaa	acgtgactta	ttttttctca	acaaggatgc	agcactcac	3060
atggagccta	agaaagaaaa	aatggagcca	ggcctggaac	aaggcaagaa	accaagacta	3120
gatagcgtca	ccagcagcga	aagctttgcg	agctccggct	tcaggaaga	taaaagtctg	3180
agtgatgttg	aggaagagga	ggattctgac	ggtttctaca	aggagcccat	cactatggaa	3240
gatctgattt	cttacagttt	tcaagtggcc	agaggtcattg	agttcctgtc	ttccagaag	3300
tgattatcat	gggacctggc	agcgagaaac	attcttttat	ctgagaacaa	cgtggtgaa	3360
atthgtgatt	ttggccttgc	ccgggatatt	tataagaacc	ccgattatgt	gagaaaagga	3420
gatactcgac	ttcctctgaa	atggatggct	cccgaatcta	tctttgacaa	aatctacagc	3480
accaagagcg	acgtgtggct	ttacggagta	ttgtctgtgg	aaatcttctc	cttaggtggg	3540
tctccatacc	caggagtaca	aatggatgag	gacttttgca	gtcgcctgag	ggaaggcatg	3600
aggatgagag	ctcctgagta	ctctactcct	gaaatctatc	agatcatgct	ggactgctgg	3660
cacagagacc	caaaagaaag	gccaagattt	gcagaacttg	tggaaaaact	aggtgatttg	3720
cttcaagcaa	atgtacaaca	ggatggtaaa	gactacatcc	caatcaatgc	catactgaca	3780
ggaaatagtg	ggtttacata	ctcaactcct	gccttctctg	aggacttctt	caaggaaagt	3840
atthcagctc	cgaagtttaa	ttcaggaagc	tctgatgatg	tcagatatgt	aaatgctttc	3900
aagttcatga	gcctggaaaag	aatcaaaaacc	tttgaagaac	ttttaccgaa	tgccacctcc	3960
atgtttgatg	actaccaggg	cgacagcagc	actctgttgg	cctctcccat	gctgaagcgc	4020
ttcacctgga	ctgacagcaa	acccaaggcc	tcgctcaaga	ttgacttgag	agtaaccagt	4080
aaaagtaagg	agtcggggct	gtctgatgtc	agcagggcca	gtttctgcca	ttccagctgt	4140
gggcacgtca	gcgaaggcaa	gcgcaggttc	acctacgacc	acgctgagct	ggaagggaaa	4200
atcgcgtgct	gctccccgcc	cccagactac	aactcgggtg	tcctgtactc	cacccccacc	4260
atctagagtt	tgacacgaag	ccttatttct	agaagcacat	gtgtatttat	acccccagga	4320
aactagcttt	tgccagtatt	atgcatatata	aagtttacac	ctttatcttt	ccatgggagc	4380
cagctgcttt	ttgtgatttt	tttaatagtg	cttttttttt	ttgactaaca	agaatgtaac	4440
tccagataga	gaaatagtga	caagtgaaga	acactactgc	taaatectca	tgttactcag	4500
tgtttagagaa	atccttccta	aacccaatga	cttccctgct	ccaacccccg	ccacctcagg	4560
gcacgcagga	ccagtttgat	tgaggagctg	cactgatcac	ccaatgcatc	acgtacccca	4620
ctggggcagc	ctgacagccc	aaaaccaggg	gcaacaagcc	cgttagcccc	aggggatcac	4680
tggctggcct	gagcaacatc	tcgggagtcc	tctagcaggc	ctaagacatg	tgaggaggaa	4740
aaggaaaaaa	agcaaaaagc	aagggagaaa	agagaaaaccg	ggagaaggca	tgagaaagaa	4800
tttgagacgc	accatgtggg	cacggagggg	gacggggctc	agcaatgcca	tttcagtggc	4860
ttcccagctc	tgacccttct	acatttgagg	gcccagccag	gagcagatgg	acagcgatga	4920
ggggacattt	tctggattct	gggaggcaag	aaaaggacaa	atatcttttt	tggaactaaa	4980
gcaaatthta	gacctttacc	tatggaagtg	gttctatgtc	cattctcatt	cgtggcatgt	5040
tttgattttg	agcactgagg	gtggcactca	actctgagcc	catacttttg	gctcctctag	5100
taagatgcac	tgaaaactta	gccagagtta	ggttgtctcc	aggccatgat	ggccttacac	5160
tgaaaatgtc	acattctatt	ttgggtatta	atatatagtc	cagacactta	actcaatttc	5220
ttggtattat	tctgttttgc	acagttagtt	gtgaaagaaa	gctgagaaga	atgaaaatgc	5280
agtcctgagg	agagttttct	ccatatcaaa	acgagggctg	atggaggaaa	aaggtcaata	5340
aggtcaaggg	aagaccccg	ctctatacca	accaaacc	ttcaccaaca	cagttgggac	5400
ccaaaacaca	ggaagtcagt	cacgtttcct	tttcatttaa	tggggattcc	actatctcac	5460
actaatctga	aaggatgtgg	aagagcatta	gctggcgcac	attaagcact	ttaagctcct	5520
tgagtaaaaa	gggtgatctg	aatttatgca	aggtatttct	ccagttggga	ctcaggatat	5580
tagttaatga	gccatcacta	gaagaaaagc	ccattttcaa	ctgctttgaa	acttgctgg	5640
ggctctgagca	tgatgggaat	agggagacag	ggttaggaaag	ggcgcctact	cttcagggtc	5700
taaagatcaa	gtgggccttg	gatcgctaag	ctggctctgt	ttgatgctat	ttatgcaagt	5760
tagggctctat	gtattta					5777

<210> 15

<211> 1338

<212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> DOMINIO
 5 <222> (235)...(336)
 <223> dominio 3
 <400> 15

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

ES 2 407 859 T3

Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu
 370 375 380
 Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400
 Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415
 Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
 420 425 430
 Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser
 435 440 445
 Arg Gln Ile Leu Thr Cys Thr Ala Tyr Gly Ile Pro Gln Pro Thr Ile
 450 455 460
 Lys Trp Phe Trp His Pro Cys Asn His Asn His Ser Glu Ala Arg Cys
 465 470 475 480
 Asp Phe Cys Ser Asn Asn Glu Glu Ser Phe Ile Leu Asp Ala Asp Ser
 485 490 495
 Asn Met Gly Asn Arg Ile Glu Ser Ile Thr Gln Arg Met Ala Ile Ile
 500 505
 Glu Gly Lys Asn Lys Met Ala Ser Thr Leu Val Val Ala Asp Ser Arg
 515 520 525
 Ile Ser Gly Ile Tyr Ile Cys Ile Ala Ser Asn Lys Val Gly Thr Val
 530 535 540
 Gly Arg Asn Ile Ser Phe Tyr Ile Thr Asp Val Pro Asn Gly Phe His
 545 550 555 560
 Val Asn Leu Glu Lys Met Pro Thr Glu Gly Glu Asp Leu Lys Leu Ser
 565 570 575
 Cys Thr Val Asn Lys Phe Leu Tyr Arg Asp Val Thr Trp Ile Leu Leu
 580 585 590
 Arg Thr Val Asn Asn Arg Thr Met His Tyr Ser Ile Ser Lys Gln Lys
 595 600 605
 Met Ala Ile Thr Lys Glu His Ser Ile Thr Leu Asn Leu Thr Ile Met
 610 615 620
 Asn Val Ser Leu Gln Asp Ser Gly Thr Tyr Ala Cys Arg Ala Arg Asn
 625 630 635 640
 Val Tyr Thr Gly Glu Glu Ile Leu Gln Lys Lys Glu Ile Thr Ile Arg
 645 650 655
 Asp Gln Glu Ala Pro Tyr Leu Leu Arg Asn Leu Ser Asp His Thr Val
 660 665 670
 Ala Ile Ser Ser Ser Thr Thr Leu Asp Cys His Ala Asn Gly Val Pro
 675 680 685
 Glu Pro Gln Ile Thr Trp Phe Lys Asn Asn His Lys Ile Gln Gln Glu
 690 695 700
 Pro Gly Ile Ile Leu Gly Pro Gly Ser Ser Thr Leu Phe Ile Glu Arg
 705 710 715 720
 Val Thr Glu Glu Asp Glu Gly Val Tyr His Cys Lys Ala Thr Asn Gln
 725 730 735
 Lys Gly Ser Val Glu Ser Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Gly Thr Ser
 740 745 750
 Asp Lys Ser Asn Leu Glu Leu Ile Thr Leu Thr Cys Thr Cys Val Ala
 755 760 765
 Ala Thr Leu Phe Trp Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ile Arg Lys Met Lys
 770 775 780
 Arg Ser Ser Ser Glu Ile Lys Thr Asp Tyr Leu Ser Ile Ile Met Asp
 785 790 795 800
 Pro Asp Glu Val Pro Leu Asp Glu Gln Cys Glu Arg Leu Pro Tyr Asp
 805 810 815
 Ala Ser Lys Trp Glu Phe Ala Arg Glu Arg Leu Lys Leu Gly Lys Ser
 820 825 830
 Leu Gly Arg Gly Ala Phe Gly Lys Val Val Gln Ala Ser Ala Phe Gly
 835 840 845
 Ile Lys Lys Ser Pro Thr Cys Arg Thr Val Ala Val Lys Met Leu Lys
 850 855 860
 Glu Gly Ala Thr Ala Ser Glu Tyr Lys Ala Leu Met Thr Glu Leu Lys

```

865                               870                               875                               880
Ile Leu Thr His Ile Gly His His Leu Asn Val Val Asn Leu Leu Gly
      885
Ala Cys Thr Lys Gln Gly Gly Pro Leu Met Val Ile Val Glu Tyr Cys
      900
Lys Tyr Gly Asn Leu Ser Asn Tyr Leu Lys Ser Lys Arg Asp Leu Phe
      915
Phe Leu Asn Lys Asp Ala Ala Leu His Met Glu Pro Lys Lys Glu Lys
      930
Met Glu Pro Gly Leu Glu Gln Gly Lys Lys Pro Arg Leu Asp Ser Val
      945
Thr Ser Ser Glu Ser Phe Ala Ser Ser Gly Phe Gln Glu Asp Lys Ser
      965
Leu Ser Asp Val Glu Glu Glu Glu Asp Ser Asp Gly Phe Tyr Lys Glu
      980
Pro Ile Thr Met Glu Asp Leu Ile Ser Tyr Ser Phe Gln Val Ala Arg
      995
Gly Met Glu Phe Leu Ser Ser Arg Lys Cys Ile His Arg Asp Leu Ala
      1010
Ala Arg Asn Ile Leu Leu Ser Glu Asn Asn Val Val Lys Ile Cys Asp
      1025
Phe Gly Leu Ala Arg Asp Ile Tyr Lys Asn Pro Asp Tyr Val Arg Lys
      1045
Gly Asp Thr Arg Leu Pro Leu Lys Trp Met Ala Pro Glu Ser Ile Phe
      1060
Asp Lys Ile Tyr Ser Thr Lys Ser Asp Val Trp Ser Tyr Gly Val Leu
      1075
Leu Trp Glu Ile Phe Ser Leu Gly Gly Ser Pro Tyr Pro Gly Val Gln
      1090
Met Asp Glu Asp Phe Cys Ser Arg Leu Arg Glu Gly Met Arg Met Arg
      1105
Ala Pro Glu Tyr Ser Thr Pro Glu Ile Tyr Gln Ile Met Leu Asp Cys
      1125
Trp His Arg Asp Pro Lys Glu Arg Pro Arg Phe Ala Glu Leu Val Glu
      1140
Lys Leu Gly Asp Leu Leu Gln Ala Asn Val Gln Gln Asp Gly Lys Asp
      1155
Tyr Ile Pro Ile Asn Ala Ile Leu Thr Gly Asn Ser Gly Phe Thr Tyr
      1170
Ser Thr Pro Ala Phe Ser Glu Asp Phe Phe Lys Glu Ser Ile Ser Ala
      1185
Pro Lys Phe Asn Ser Gly Ser Ser Asp Asp Val Arg Tyr Val Asn Ala
      1205
Phe Lys Phe Met Ser Leu Glu Arg Ile Lys Thr Phe Glu Glu Leu Leu
      1220
Pro Asn Ala Thr Ser Met Phe Asp Asp Tyr Gln Gly Asp Ser Ser Thr
      1235
Leu Leu Ala Ser Pro Met Leu Lys Arg Phe Thr Trp Thr Asp Ser Lys
      1250
Pro Lys Ala Ser Leu Lys Ile Asp Leu Arg Val Thr Ser Lys Ser Lys
      1265
Glu Ser Gly Leu Ser Asp Val Ser Arg Pro Ser Phe Cys His Ser Ser
      1285
Cys Gly His Val Ser Glu Gly Lys Arg Arg Phe Thr Tyr Asp His Ala
      1300
Glu Leu Glu Arg Lys Ile Ala Cys Cys Ser Pro Pro Pro Asp Tyr Asn
      1315
ser Val Val Leu Tyr Ser Thr Pro Pro Ile
      1330
      1335

```

<210> 16

<211> 5830

<212> ADN

5 <213> Homo sapiens

<400> 16

actgagtc	ccc	gggacccc	gg	gagagcgg	tc	agtgtgtg	gt	cgctgcg	ttt	cctctgc	ctg	60
cgccggg	cat	cacttgc	gc	ccgcagaa	ag	tccgtctg	gg	agcctgg	ata	tcctctc	cta	120
ccggcac	cc	cagacgc	ccc	tg	cagcgc	cc	gg	cggtcgc	cc	agccctg	tg	180
gctcaac	tgt	cctgcg	ct	gg	gggtgc	cc	g	gagttcc	acc	tccgcgc	ctc	240
cagggcg	tgg	gagaaa	gaac	cg	gctccc	ga	gt	tctggg	ca	tttcgccc	gg	300
aggatgc	aga	gcaagg	tgt	g	ctggcc	gt	gc	cctgtgg	c	tctgcgt	gga	360
gcctctg	tgg	gtttgc	ctag	t	gtttct	ctt	g	atctgccc	a	ggctcag	cat	420
atactta	caa	ttaagg	ctaa	t	acaact	ctt	c	caaattac	tt	gcagggg	aca	480
gactggc	ttt	ggccaata	a	t	cagagt	ggc	g	agtgagca	aa	gggtgg	agg	540
agcgatg	ggc	tcttctg	taa	g	acactc	aca	a	attccaaa	ag	tgatcgg	aaa	600
gcctaca	agt	gcttctac	cg	g	gaaact	gac	t	ttggcctc	gg	tcatttat	gt	660
gattacag	at	ctccattt	at	t	gcttct	ggt	t	agtgacca	ac	atggagt	cg	720
gagaacaa	aaa	acaaaact	gt	g	gtgatt	cca	a	tgtctcgg	gt	ccatttca	aaa	780
tcacttt	gtg	caagata	ccc	a	gaaaag	aga	a	tttgttct	tg	atggta	acag	840
gacagca	aga	agggct	ttac	t	attccc	cagc	c	tacatgat	ca	gctatgt	ctgg	900
tgtgaag	caa	aaatta	atga	t	gaaagt	ttac	c	cagctatta	t	tgtacata	gt	960
gggtatag	gga	tttatgat	gt	g	gttctg	agt	t	ccgtctca	tg	gaattga	act	1020
gaaaagc	ttg	tcttaa	attg	t	tacagca	aga	a	actgaa	ctaa	atgtggg	gat	1080
tgggaat	acc	cttcttc	gaa	g	catcag	cat	a	aagaaact	tg	taaaccg	aga	1140
cagtctg	gga	gtgagat	gaa	g	aaaatt	ttt	t	agcacct	taa	ctataga	tgg	1200
agtgacca	g	gattgt	acag	c	ctgtgc	agca	a	tccagtgg	gc	tgatgacc	aa	1260
acattt	gtca	gggtcc	atga	a	aaaact	ttt	t	gttgcttt	tg	gaagtgg	cat	1320
gtggaag	cca	cggtgg	ggga	g	cggtgt	caga	a	atccctgc	ga	agtacct	gg	1380
ccagaaat	aa	aatgg	tataa	a	aatgga	ata	a	cccctgag	t	ccaatcac	ac	1440
gggcatg	tac	tgacg	attat	g	ggaagt	gagt	t	gaaagaga	ca	caggaa	atta	1500
cttacc	aatc	ccattt	caaa	a	ggagaag	cag	a	agccatgt	gg	tctctct	ggt	1560
ccacccc	aga	ttggtg	agaa	a	atctcta	atc	a	tctctctg	gg	attcctac	ca	1620
actcaa	acgc	tgacat	gtac	g	ggtctat	gcc	a	attcctcc	cc	cgcatcac	at	1680
tggcag	ttgg	aggaag	agtg	a	cgccaac	gag	a	cccagcca	ag	ctgtctc	agt	1740
taccctt	gtg	aagaat	ggag	a	aagtgt	ggag	a	gacttcc	agg	gagga	ataa	1800
aataaaa	atc	aatttgc	tct	a	aaatga	agga	a	aaaaacaa	aaa	ctgtaag	tac	1860
caagcgg	caa	atgtgt	cagc	a	tttgtac	aaa	a	tgtgaag	cgg	tcaacaa	agt	1920
gagaggg	tga	tcicct	tcca	a	cgtgacc	cagg	a	ggtctgaa	aaa	ttacttt	gca	1980
cagccc	actg	agcagg	agag	a	cg	gtcttt	t	tggtgc	actg	cagacag	atc	2040
aacctcac	at	ggtaca	agct	t	tg	ggccc	acag	cctctgcc	aa	tccatgt	ggg	2100
acacctg	ttt	gcaaga	actt	t	ggatact	ctt	a	tggaaatt	gga	atgccacc	at	2160
agcaca	aatg	acattt	tgtat	a	catggag	ctt	a	aagaatgc	at	ccttgcag	gga	2220
tatgtct	gccc	ttgtc	caaga	a	caggaag	acc	a	aagaaaag	ac	atttgc	gtgt	2280
acagtc	cctag	agcgtg	tggc	a	accacg	atc	a	acagga	aac	tggaga	atca	2340
attgggg	aaag	gcatcga	agt	a	ctcatgc	cag	a	gcatctgg	ga	atcccc	ctc	2400
tggtttaa	g	ataatg	agac	a	ccttgt	agaa	a	gactcagg	ca	ttgtatt	gaa	2460
cggaacct	ca	ctatcc	gcag	a	agtgag	gaag	a	gaggac	gaag	gcctctac	ac	2520
tgcagt	gttc	ttggc	tgtg	a	aaaagt	ggag	a	gcatttt	ca	taataga	agg	2580
aagacga	act	tggaa	tcat	a	tattct	agta	a	ggcacgg	cgg	tgattg	ccat	2640
ctactt	cttg	tcatcat	cct	a	acggacc	ggt	a	aagcggg	cca	atggagg	gga	2700
ggctact	tgt	ccatc	gtcat	a	ggatcc	agat	a	gaactccc	at	tggatga	aca	2760
ctgcctt	atg	atgccag	caa	a	atggga	attc	a	cccagag	acc	ggctga	agct	2820
cttggcc	gtg	gtgcct	tgg	a	ccaagt	gatt	a	gaagcag	atg	cctttgg	aat	2880
gcaact	tgca	ggacag	tagc	a	agtcaaa	atg	a	ttgaaaga	ag	gagcaac	aca	2940
cgagct	ctca	tgtctga	act	a	caagat	ctc	a	attcatat	t	gtcacc	atct	3000
aacctt	ctag	gtcctgt	ac	a	caagcc	agga	a	ggccactc	a	tgggtat	tgt	3060
aaattt	ggaa	acctgt	ccac	a	ttacct	gagg	a	agcaaga	gaa	atgaatt	tgt	3120
accaa	gggg	cag	attccg	a	tcaagg	gaaa	a	gactac	gtt	gagca	atccc	3180
aaacgg	cgt	tggac	agcat	a	caccag	tagc	a	cagagct	cag	ccagct	ctg	3240
gagaag	tccc	tcagt	gatgt	a	agaaga	agag	a	gaagct	cctg	aagatct	gta	3300
ctgac	cttgg	agcat	ctcat	a	ctgttac	agc	a	ttccaagt	gg	ctaagg	gcat	3360
gcatc	gcgaa	agtgt	atcca	a	caggg	acctg	a	gcggcac	gaa	atatac	ctct	3420
aacgt	ggtta	aaatct	gtga	a	ctttgg	cctg	a	gccccg	gata	tttataa	aga	3480
gtcagaa	aaag	gagatg	ctcg	a	cctcc	ctttg	a	aatggat	ggt	cccagaa	ac	3540

ES 2 407 859 T3

```

agagtgtaca caatccagag tgacgtctgg tcttttgggtg ttttgctgtg ggaaatattt 3600
tccttaggtg cttctccata tcctggggta aagattgatg aagaattttg taggcgattg 3660
aaagaaggaa ctagaatgag ggcccctgat tatactacac cagaaatgta ccagaccatg 3720
ctggactgct ggcacgggga gccccagtcag agaccacagt tttcagagtt ggtggaacat 3780
ttgggaaatc tcttgcaagc taatgctcag caggatggca aagactacat tgttcttccg 3840
atatcagaga ctttgagcat ggaagaggat tctggactct ctctgcctac ctcacctgtt 3900
tcctgtatgg aggaggagga agtatgtgac cccaaattcc attatgacaa cacagcagga 3960
atcagtcagt atctgcagaa cagtaagcga aagagccggc ctgtgagtgt aaaaacattt 4020
gaagatatcc cgttagaaga accagaagta aaagtaatcc cagatgacaa ccagacggac 4080
agtggtatgg ttcttgccctc agaagagctg aaaactttgg aagacagaac caaattatct 4140
ccatcttttg gtggaatggt gccagcaaaa agcagggagt ctgtggcatc tgaaggctca 4200
aaccagacaa gcggtaccac gtccggatat cactccgatg acacagacac caccgtgtac 4260
tccagtgagg aagcagaact tttaaagctg atagagattg gagtgcaaac cggtagcaca 4320
gccagattc tccagcctga ctcggggacc acataggact ctctctctgt ttaaaaggaa 4380
gcatccacac cccaactccc ggacatcaca tgagaggctt gctcagattt tgaagtgtg 4440
ttctttccac cagcaggaag tagccgattt tgattttcat ttcgacaaca gaaaaaggac 4500
ctcggactgc agggagccag tcttctaggc atatcctgga agaggcttgt gacccaagaa 4560
tgtgtctgtg tcttctccca gtgttgacct gatcctcttt tttcattcat ttaaaaagca 4620
ttaicctgcc cctgtgctgg gtctcaccat gggtttagaa caaagagctt caagcaatgg 4680
ccccatctc aaagaagtag cagtacctgg ggagctgaca cttctgtaaa actagaagat 4740
aaaccaggca acgtaagtgt tcgaggtggt gaagatggga aggatttgca gggctgagtc 4800
tatccaagag gctttgttta ggacgtgggt cccaagccaa gccttaagtg tggaaattcgg 4860
attgatagaa aggaagacta acgttacctt gctttggaga gtactggagc ctgcaaatgc 4920
attgtgtttg ctctgggtgga ggtgggcatg gggctctgtt tgaaatgtaa agggttcaga 4980
cggggtttct ggttttagaa ggttgctgtg tcttcgagtt gggctaaagt agagtctggt 5040
gtgctgtttc tgactcctaa tgagagttcc ttccagaccg ttagctgtct ccttgccaag 5100
ccccggaag aaaatgatgc agctctggct ccttgtctcc caggctgatc ctttattcag 5160
aataccacaa agaaaggaca ttcagctcaa ggcctccctg cgtgttgaag agttctgact 5220
gcacaaacca gcttctgggt tcttctggaa tgaatacctt catatctgtc ctgatgtgat 5280
atgtctgaga ctgaatgcgg gaggttcaat gtgaagctgt gtgtggtgtc aaagtctcag 5340
gaaggatttt acccttttgt tcttccccct gtccccacc cactctcacc ccgcaacca 5400
tcagtatttt agttatttgg cctctactcc agtaaacctg attgggtttg ttcactctct 5460
gaatgattat tagccagatt tcaaaattat tttatagccc aaattataac atctattgta 5520
ttatttagac ttttaacata tagagctatt tctactgatt tttgcccttg ttctgtcctt 5580
tttttcaaaa aagaaaatgt gttttttggt tggtaccata gtgtgaaatg ctgggaacaa 5640
tgactataag acatgctatg gcacatatat ttatagtctg tttatgtaga aacaaatgta 5700
atatattaaa gccttatata taatgaactt tgtactatc acattttgta tcagtattat 5760
gtagcataac aaaggtcata atgctttcag caattgatgt cattttatta aagaacattg 5820
aaaaacttga

```

<210> 17

<211> 1356

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 17

```

Met Gln Ser Lys Val Leu Leu Ala Val Ala Leu Trp Leu Cys Val Glu
 1          5          10          15
Thr Arg Ala Ala Ser Val Gly Leu Pro Ser Val Ser Leu Asp Leu Pro
          20          25          30
Arg Leu Ser Ile Gln Lys Asp Ile Leu Thr Ile Lys Ala Asn Thr Thr
          35          40          45
Leu Gln Ile Thr Cys Arg Gly Gln Arg Asp Leu Asp Trp Leu Trp Pro
          50          55          60
Asn Asn Gln Ser Gly Ser Glu Gln Arg Val Glu Val Thr Glu Cys Ser
          65          70          75          80
Asp Gly Leu Phe Cys Lys Thr Leu Thr Ile Pro Lys Val Ile Gly Asn
          85          90          95
Asp Thr Gly Ala Tyr Lys Cys Phe Tyr Arg Glu Thr Asp Leu Ala Ser
          100          105          110
Val Ile Tyr Val Tyr Val Gln Asp Tyr Arg Ser Pro Phe Ile Ala Ser

```

ES 2 407 859 T3

		115					120					125			
Val	Ser	Asp	Gln	His	Gly	Val	Val	Tyr	Ile	Thr	Glu	Asn	Lys	Asn	Lys
	130					135					140				
Thr	Val	Val	Ile	Pro	Cys	Leu	Gly	Ser	Ile	Ser	Asn	Leu	Asn	Val	Ser
145					150					155					160
Leu	Cys	Ala	Arg	Tyr	Pro	Glu	Lys	Arg	Phe	Val	Pro	Asp	Gly	Asn	Arg
				165					170					175	
Ile	Ser	Trp	Asp	Ser	Lys	Lys	Gly	Phe	Thr	Ile	Pro	Ser	Tyr	Met	Ile
			180					185					190		
Ser	Tyr	Ala	Gly	Met	Val	Phe	Cys	Glu	Ala	Lys	Ile	Asn	Asp	Glu	Ser
		195					200					205			
Tyr	Gln	Ser	Ile	Met	Tyr	Ile	Val	Val	Val	Val	Gly	Tyr	Arg	Ile	Tyr
	210					215					220				
Asp	Val	Val	Leu	Ser	Pro	Ser	His	Gly	Ile	Glu	Leu	Ser	Val	Gly	Glu
225					230					235					240
Lys	Leu	Val	Leu	Asn	Cys	Thr	Ala	Arg	Thr	Glu	Leu	Asn	Val	Gly	Ile
				245					250					255	
Asp	Phe	Asn	Trp	Glu	Tyr	Pro	Ser	Ser	Lys	His	Gln	His	Lys	Lys	Leu
			260					265					270		
Val	Asn	Arg	Asp	Leu	Lys	Thr	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Met	Lys	Lys	Phe
		275					280					285			
Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gly	Val	Thr	Arg	Ser	Asp	Gln	Gly	Leu
	290					295					300				
Tyr	Thr	Cys	Ala	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Met	Thr	Lys	Lys	Asn	Ser	Thr
305					310					315					320
Phe	Val	Arg	Val	His	Glu	Lys	Pro	Phe	Val	Ala	Phe	Gly	Ser	Gly	Met
				325					330					335	
Glu	Ser	Leu	Val	Glu	Ala	Thr	Val	Gly	Glu	Arg	Val	Arg	Ile	Pro	Ala
			340					345					350		
Lys	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Pro	Pro	Pro	Glu	Ile	Lys	Trp	Tyr	Lys	Asn	Gly
		355					360					365			
Ile	Pro	Leu	Glu	Ser	Asn	His	Thr	Ile	Lys	Ala	Gly	His	Val	Leu	Thr
	370					375					380				
Ile	Met	Glu	Val	Ser	Glu	Arg	Asp	Thr	Gly	Asn	Tyr	Thr	Val	Ile	Leu
385					390					395					400
Thr	Asn	Pro	Ile	Ser	Lys	Glu	Lys	Gln	Ser	His	Val	Val	Ser	Leu	Val
				405					410					415	
Val	Tyr	Val	Pro	Pro	Gln	Ile	Gly	Glu	Lys	Ser	Leu	Ile	Ser	Pro	Val
			420					425					430		
Asp	Ser	Tyr	Gln	Tyr	Gly	Thr	Thr	Gln	Thr	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Tyr
		435					440					445			
Ala	Ile	Pro	Pro	Pro	His	His	Ile	His	Trp	Tyr	Trp	Gln	Leu	Glu	Glu
	450					455					460				
Glu	Cys	Ala	Asn	Glu	Pro	Ser	Gln	Ala	Val	Ser	Val	Thr	Asn	Pro	Tyr
465				470						475					480
Pro	Cys	Glu	Glu	Trp	Arg	Ser	Val	Glu	Asp	Phe	Gln	Gly	Gly	Asn	Lys
				485					490					495	
Ile	Glu	Val	Asn	Lys	Asn	Gln	Phe	Ala	Leu	Ile	Glu	Gly	Lys	Asn	Lys
			500					505					510		
Thr	Val	Ser	Thr	Leu	Val	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Val	Ser	Ala	Leu	Tyr
		515					520					525			
Lys	Cys	Glu	Ala	Val	Asn	Lys	Val	Gly	Arg	Gly	Glu	Arg	Val	Ile	Ser
	530					535					540				
Phe	His	Val	Thr	Arg	Gly	Pro	Glu	Ile	Thr	Leu	Gln	Pro	Asp	Met	Gln
545					550					555					560
Pro	Thr	Glu	Gln	Glu	Ser	Val	Ser	Leu	Trp	Cys	Thr	Ala	Asp	Arg	Ser
				565					570					575	
Thr	Phe	Glu	Asn	Leu	Thr	Trp	Tyr	Lys	Leu	Gly	Pro	Gln	Pro	Leu	Pro
			580					585					590		
Ile	His	Val	Gly	Glu	Leu	Pro	Thr	Pro	Val	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Thr
		595					600					605			
Leu	Trp	Lys	Leu	Asn	Ala	Thr	Met	Phe	Ser	Asn	Ser	Thr	Asn	Asp	Ile
	610					615					620				

ES 2 407 859 T3

Leu 625	Ile	Met	Glu	Leu	Lys 630	Asn	Ala	Ser	Leu	Gln 635	Asp	Gln	Gly	Asp	Tyr 640
Val	Cys	Leu	Ala	Gln 645	Asp	Arg	Lys	Thr	Lys 650	Lys	Arg	His	Cys	Val 655	Val
Arg	Gln	Leu	Thr 660	Val	Leu	Glu	Arg	Val 665	Ala	Pro	Thr	Ile	Thr 670	Gly	Asn
Leu	Glu	Asn 675	Gln	Thr	Thr	Ser	Ile 680	Gly	Glu	Ser	Ile	Glu 685	Val	Ser	Cys
Thr	Ala 690	Ser	Gly	Asn	Pro	Pro	Pro 695	Gln	Ile	Met	Trp 700	Phe	Lys	Asp	Asn
Glu 705	Thr	Leu	Val	Glu	Asp 710	Ser	Gly	Ile	Val	Leu 715	Lys	Asp	Gly	Asn	Arg 720
Asn	Leu	Thr	Ile	Arg 725	Arg	Val	Arg	Lys	Glu 730	Asp	Glu	Gly	Leu	Tyr 735	Thr
Cys	Gln	Ala 740	Cys	Ser	Val	Leu	Gly 745	Cys	Ala	Lys	Val	Glu	Ala 750	Phe	Phe
Ile	Ile	Glu 755	Gly	Ala	Gln	Glu	Lys 760	Thr	Asn	Leu	Glu	Ile 765	Ile	Ile	Leu
Val	Gly 770	Thr	Ala	Val	Ile	Ala	Met 775	Phe	Phe	Trp	Leu 780	Leu	Leu	Val	Ile
Ile 785	Leu	Arg	Thr	Val	Lys 790	Arg	Ala	Asn	Gly	Gly 795	Glu	Leu	Lys	Thr	Gly 800
Tyr	Leu	Ser	Ile	Val 805	Met	Asp	Pro	Asp	Glu 810	Leu	Pro	Leu	Asp	Glu 815	His
Cys	Glu	Arg	Leu 820	Pro	Tyr	Asp	Ala	Ser 825	Lys	Trp	Glu	Phe	Pro 830	Arg	Asp
Arg	Leu	Lys 835	Leu	Gly	Lys	Pro	Leu 840	Gly	Arg	Gly	Ala	Phe 845	Gly	Gln	Val
Ile	Glu 850	Ala	Asp	Ala	Phe	Gly 855	Ile	Asp	Lys	Thr	Ala 860	Thr	Cys	Arg	Thr
Val 865	Ala	Val	Lys	Met	Leu 870	Lys	Glu	Gly	Ala	Thr 875	His	Ser	Glu	His	Arg 880
Ala	Leu	Met	Ser	Glu 885	Leu	Lys	Ile	Leu	Ile 890	His	Ile	Gly	His	His 895	Leu
Asn	Val	Val	Asn 900	Leu	Leu	Gly	Ala	Cys 905	Thr	Lys	Pro	Gly	Gly 910	Pro	Leu
Met	Val	Ile 915	Val	Glu	Phe	Cys	Lys 920	Phe	Gly	Asn	Leu	Ser 925	Thr	Tyr	Leu
Arg	Ser 930	Lys	Arg	Asn	Glu	Phe 935	Val	Pro	Tyr	Lys	Thr 940	Lys	Gly	Ala	Arg
Phe 945	Arg	Gln	Gly	Lys	Asp 950	Tyr	Val	Gly	Ala	Ile 955	Pro	Val	Asp	Leu	Lys 960
Arg	Arg	Leu	Asp	Ser 965	Ile	Thr	Ser	Ser	Gln 970	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser 975	Gly
Phe	Val	Glu 980	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	Asp 985	Val	Glu	Glu	Glu	Glu 990	Ala	Pro
Glu	Asp	Leu 995	Tyr	Lys	Asp	Phe	Leu 1000	Thr	Leu	Glu	His	Leu 1005	Ile	Cys	Tyr
Ser	Phe 1010	Gln	Val	Ala	Lys	Gly 1015	Met	Glu	Phe	Leu	Ala 1020	Ser	Arg	Lys	Cys
Ile 1025	His	Arg	Asp	Leu	Ala 1030	Ala	Arg	Asn	Ile	Leu 1035	Leu	Ser	Glu	Lys	Asn 1040
Val	Val	Lys	Ile	Cys 1045	Asp	Phe	Gly	Leu	Ala 1050	Arg	Asp	Ile	Tyr	Lys 1055	Asp
Pro	Asp	Tyr	Val 1060	Arg	Lys	Gly	Asp	Ala 1065	Arg	Leu	Pro	Leu	Lys 1070	Trp	Met
Ala	Pro	Glu 1075	Thr	Ile	Phe	Asp	Arg 1080	Val	Tyr	Thr	Ile	Gln 1085	Ser	Asp	Val
Trp	Ser 1090	Phe	Gly	Val	Leu	Leu 1095	Trp	Glu	Ile	Phe	Ser 1100	Leu	Gly	Ala	Ser
Pro 1105	Tyr	Pro	Gly	Val	Lys 1110	Ile	Asp	Glu	Glu	Phe 1115	Cys	Arg	Arg	Leu	Lys 1120
Glu	Gly	Thr	Arg	Met	Arg	Ala	Pro	Asp	Tyr	Thr	Pro	Glu	Met	Tyr	

ES 2 407 859 T3

1125 1130 1135
 Gln Thr Met Leu Asp Cys Trp His Gly Glu Pro Ser Gln Arg Pro Thr
 1140 1145 1150
 Phe Ser Glu Leu Val Glu His Leu Gly Asn Leu Leu Gln Ala Asn Ala
 1155 1160 1165
 Gln Gln Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Val Leu Pro Ile Ser Glu Thr Leu
 1170 1175 1180
 Ser Met Glu Glu Asp Ser Gly Leu Ser Leu Pro Thr Ser Pro Val Ser
 1185 1190 1195 1200
 Cys Met Glu Glu Glu Glu Val Cys Asp Pro Lys Phe His Tyr Asp Asn
 1205 1210 1215
 Thr Ala Gly Ile Ser Gln Tyr Leu Gln Asn Ser Lys Arg Lys Ser Arg
 1220 1225 1230
 Pro Val Ser Val Lys Thr Phe Glu Asp Ile Pro Leu Glu Glu Pro Glu
 1235 1240 1245
 Val Lys Val Ile Pro Asp Asp Asn Gln Thr Asp Ser Gly Met Val Leu
 1250 1255 1260
 Ala Ser Glu Glu Leu Lys Thr Leu Glu Asp Arg Thr Lys Leu Ser Pro
 1265 1270 1275 1280
 Ser Phe Gly Gly Met Val Pro Ser Lys Ser Arg Glu Ser Val Ala Ser
 1285 1290 1295
 Glu Gly Ser Asn Gln Thr Ser Gly Tyr Gln Ser Gly Tyr His Ser Asp
 1300 1305 1310
 Asp Thr Asp Thr Thr Val Tyr Ser Ser Glu Glu Ala Glu Leu Leu Lys
 1315 1320 1325
 Leu Ile Glu Ile Gly Val Gln Thr Gly Ser Thr Ala Gln Ile Leu Gln
 1330 1335 1340
 Pro Asp Ser Gly Thr Thr Leu Ser Ser Pro Pro Val
 1345 1350 1355

<210> 18

<211> 675

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 18

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcg	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagacctt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcataatc	aaatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aaccagccc	360
cgagaaccac	agggtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	420
agcctgacct	gcctgggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	480
aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccc	tgctggactc	cgacggctcc	540
ttcttctct	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	600
tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	660
tctccgggta	aatag					675

10 <210> 19

<211> 224

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 19

ES 2 407 859 T3

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

<210> 20

<211> 717

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 20

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcg	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagacctt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcatac	aatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	cacatcgaca	aacccttcc	360
tgtgtgcccc	tgatgcatg	cgggggctgc	tgcaatcagc	cccgagaacc	acaggtgtac	420
accctgcccc	catcccggga	tgagctgacc	aagaaccagg	tcagcctgac	ctgcctggtc	480
aaaggcttct	atcccagcga	catcgccgtg	gagtgggaga	gcaatgggca	gccggagaac	540
aactacaaga	ccacgcctcc	cgtgctggac	tccgacggct	ccttcttctc	ctacagcaag	600
ctcaccgtgg	acaagagcag	gtggcagcag	gggaacgtct	tctcatgctc	cgtgatgcat	660
gaggctctgc	acaaccacta	cacgcagaag	agcctctccc	tgtctccggg	taaataag	717

10 <210> 21

<211> 238

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 21

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

ES 2 407 859 T3

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

<210> 22

<211> 702

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 22

atggtcagct	actgggacac	cggggtcctg	ctgtgcgcg	tgctcagctg	tctgcttctc	60
acaggatctg	gtagaccttt	cgtagagatg	tacagtgaaa	tccccgaaat	tatacacatg	120
actgaaggaa	gggagctcgt	cattccctgc	cgggttacgt	cacctaacat	cactgttact	180
ttaaaaaagt	ttccacttga	cactttgatc	cctgatggaa	aacgcataat	ctgggacagt	240
agaaagggct	tcatcataatc	aatgcaacg	tacaaagaaa	tagggcttct	gacctgtgaa	300
gcaacagtca	atgggcattt	gtataagaca	aactatctca	caatcgcaca	aaccgggtgga	360
ggtggagggtg	gaggtggagg	tcagccccga	gaaccacagg	gtacaccct	gccccatcc	420
cgggatgagc	tgaccaagaa	ccaggtcagc	ctgacctgcc	tggtcaaagg	cttctatccc	480
agcgacatcg	ccgtggagtg	ggagagcaat	gggcagccgg	agaacaacta	caagaccacg	540
cctcccgtgc	tggactccga	cggctccttc	ttcctctaca	gcaagctcac	cgtggacaag	600
agcagggtggc	agcaggggaa	cgtcttctca	tgctccgtga	tgcatgaggc	tctgcacaac	660
cactacacgc	agaagagcct	ctccctgtct	ccgggtaaat	ag		702

10 <210> 23

<211> 233

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 23

ES 2 407 859 T3

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

<210> 24

<211> 1095

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 24

```

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc      60
acaggatctg gtagaccttt cgtagagatg tacagtgaaa tccccgaaat tatacacatg      120
actgaaggaa gggagctcgt cattccctgc cgggttacgt cacctaacat cactgttact      180
ttaaaaaagt ttccacttga cactttgatc cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt      240
agaaagggct tcatcataatc aaatgcaacg tacaagaaa tagggcttct gacctgtgaa      300
gcaacagtca atgggcattt gtataagaca aactatctca cacatcgaca aaccggtgga      360
ggtagatcgg gtggaggtgg atcgggtgga ggtggatcgc ctaagagctg cgacaaaact      420
cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa ctctgggggg gaccgtcagt ctctctctc      480
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctaggtcac atgcgtggg      540
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggg      600
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggc      660
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtaca gtgcaaggc      720
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagcaa agggcagccc      780
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggc      840
agcctgacct gcctggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc      900
aatggcgagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc      960
ttcttctctc acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc     1020
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg     1080
tctccgggta aatag                                     1095
  
```

10 <210> 25

<211> 364

<212> PRT

ES 2 407 859 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Proteína de fusión recombinante o secuencia que codifica la misma

<400> 25

```

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

```

5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10

<220>

<223> enlazador de proteína de fusión

<400> 26

Gly Asp Leu Ile Tyr Arg Asn Gln Lys
 1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 27

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5

10 <210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 28

Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu Glu
 1 5

<210> 29

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 29

Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 1 5

25 <210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30 <220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 30

Gly Gly Gly Gly Gly Cys Pro Pro Cys
 1 5

<210> 31

35 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

5 <400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser
 1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 32

Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
 1 5 10

15 <210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 33

Gly Asp Leu Ile Tyr Arg Asn Gln Cys
 1 5

<210> 34

<211> 23

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> resto enlazador para proteínas de fusión

<400> 34

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Pro Ser Cys Val Pro Leu Met
 1 5 10 15
 Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn
 20

30

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión de fórmula X-Y-Z, en la que:

X comprende una porción del receptor de VEGF;

Y es un resto enlazador; y

5 Z es un dominio de multimerización,

en donde el resto enlazador Y es un polipéptido de 5-50 restos aminoacídicos que tiene una flexibilidad por encima de la media como se determina por el método de predicción de flexibilidad de Karpus y Schultz, 1985, *Naturwiss*, 72: 212-213, y donde dicha proteína de fusión se une a VEGF cuando se multimeriza.

10 2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en la que el resto enlazador Y se selecciona entre el grupo compuesto por

Gly₉ (SEC ID N° 27),

Glu₉ (SEC ID N° 28),

Ser₉ (SEC ID N° 29),

Gly₅CysPro₂Cys (SEC ID N° 30),

15 (Gly₄Ser)₃ (SEC ID N° 31),

SerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEC ID N° 32),

Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys Asn (SEC ID N° 13),

Gly-Asp-Leu-Ile-Tyr-Arg-Asn-Gln-Lys (SEC ID N° 26), y

Gly₉ProSerCysValProLeuMetArgCysGlyGlyCysCysAsn (SEC ID N° 34).

20 3. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dominio de multimerización Z causa la migración de al menos 50% de las proteínas de fusión monoméricas en un gel de poliacrilamida no desnaturizante a una velocidad que es apropiada para un multímero de la proteína de fusión.

25 4. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dominio de multimerización Z es un fragmento de una cadena pesada de IgG.

5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, en donde el dominio de multimerización Z es una secuencia de una porción de Fc de una cadena pesada de IgG1 o IgG2.

30 6. La proteína de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el dominio de multimerización Z es una región CH3 de una cadena pesada de IgG o es una porción de Fc de una molécula de anticuerpo.

7. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde X comprende el dominio 2 de tipo IgG de VEGF-R1.

35

8. La proteína de fusión de la reivindicación 7, en donde X comprende el dominio 2 de tipo IgG de VEGF-R1 pero carece de los dominios 1 y 3 de tipo Ig de VEGF-R1.

40 9. La proteína de fusión de la reivindicación 8, en donde X es el dominio 2 de tipo IgG de VEGF-R1.

10. Una composición que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables.

45 11. Un método para multimerizar un polipéptido X, comprendiendo el método unir el polipéptido X a un polipéptido Z mediante un polipéptido Y para formar un polipéptido X-Y-Z, en donde:

X comprende una porción de un receptor de VEGF;

Y es un resto enlazador; y

Z es un dominio de multimerización, en donde el resto enlazador Y es un polipéptido de 5 - 50 restos aminoacídicos que tiene una flexibilidad por encima de la media como se determina por el método de predicción de flexibilidad de Karpus y Schultz, 1985, *Naturwiss*, 72: 212-213, y donde dicha proteína de fusión se une a VEGF cuando se multimeriza.

50

12. El método de la reivindicación 11, en donde la etapa de unión comprende construir una molécula de ácido nucleico que codifica los polipéptidos X, Y y Z como un solo marco de lectura abierto, en donde dicho polipéptido X-Y-Z es expresado a partir de dicha molécula de ácido nucleico en una célula hospedante.

55

13. Una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

60

- 14.** La molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13, que codifica una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde la proteína de fusión comprende una secuencia que se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NOS: 2, 8, 21, 23 y 25.
- 5 **15.** Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o 14.
- 16.** El vector de la reivindicación 15, en donde el vector es un vector viral adeno-asociado.
- 10 **17.** Una célula de mamífero que comprende la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o 14 o el vector de la reivindicación 15 o 16.
- 18.** Un método *in vitro* que comprende suministrar el ácido nucleico de la reivindicación 13 o 14 o el vector de las reivindicaciones 15 o 16 a una célula de mamífero para producir una célula que expresa dicha proteína de fusión.
- 15 **19.** La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, la molécula de ácido nucleico de la reivindicación 13 o 14, el vector de la reivindicación 15 o 16, o la célula de mamífero de la reivindicación 17, para uso en el tratamiento de un mamífero.
- 20 **20.** La proteína de fusión, molécula de ácido nucleico, vector o célula de mamífero para uso según la reivindicación 19, en donde el mamífero tiene degeneración macular húmeda relacionada con la edad, retinopatía diabética proliferativa, cáncer, artritis reumatoide, asma, u osteoartritis.

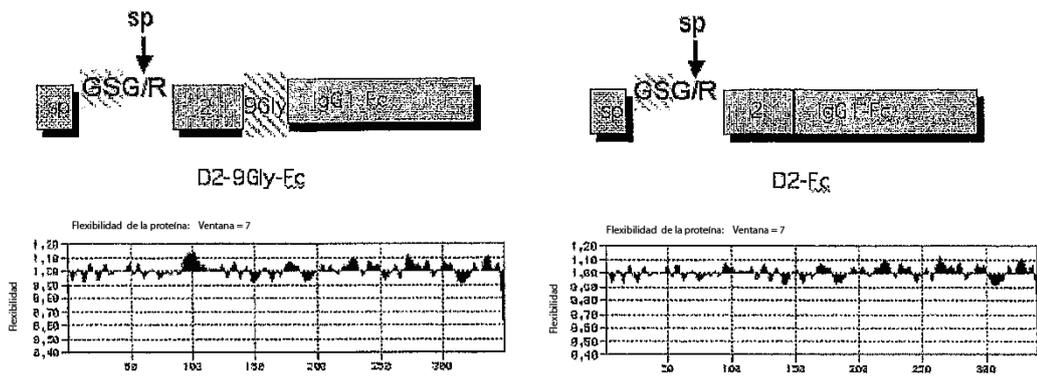


FIG 1

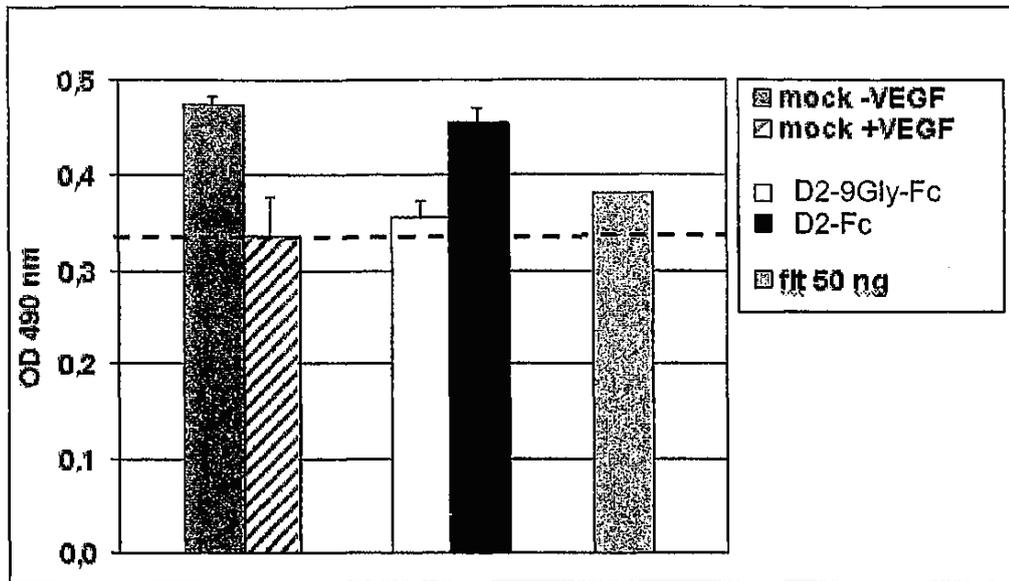


FIG 2

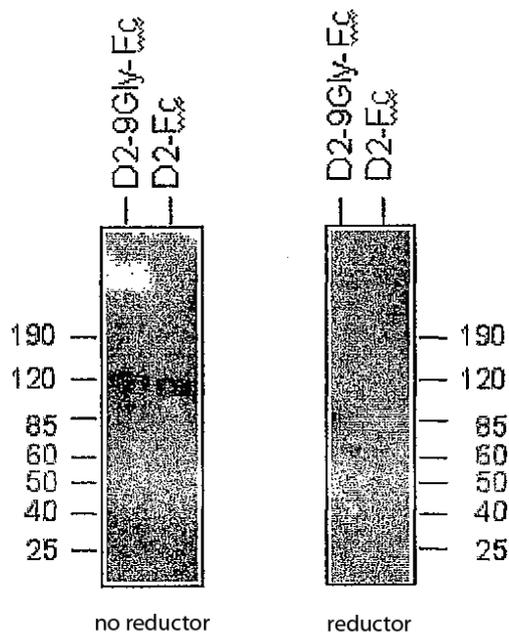


FIG 3

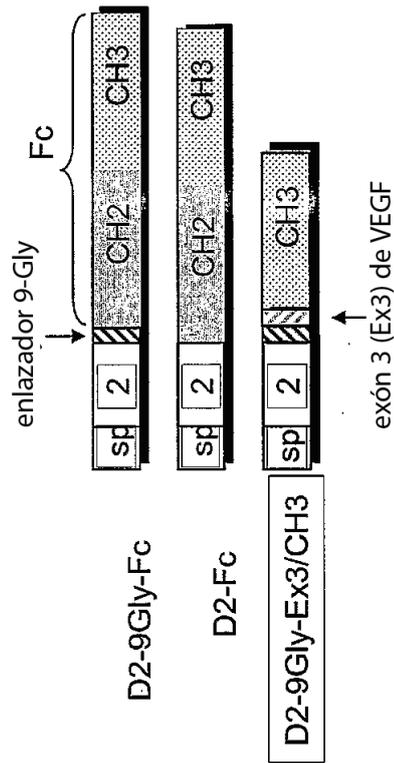


Fig. 4

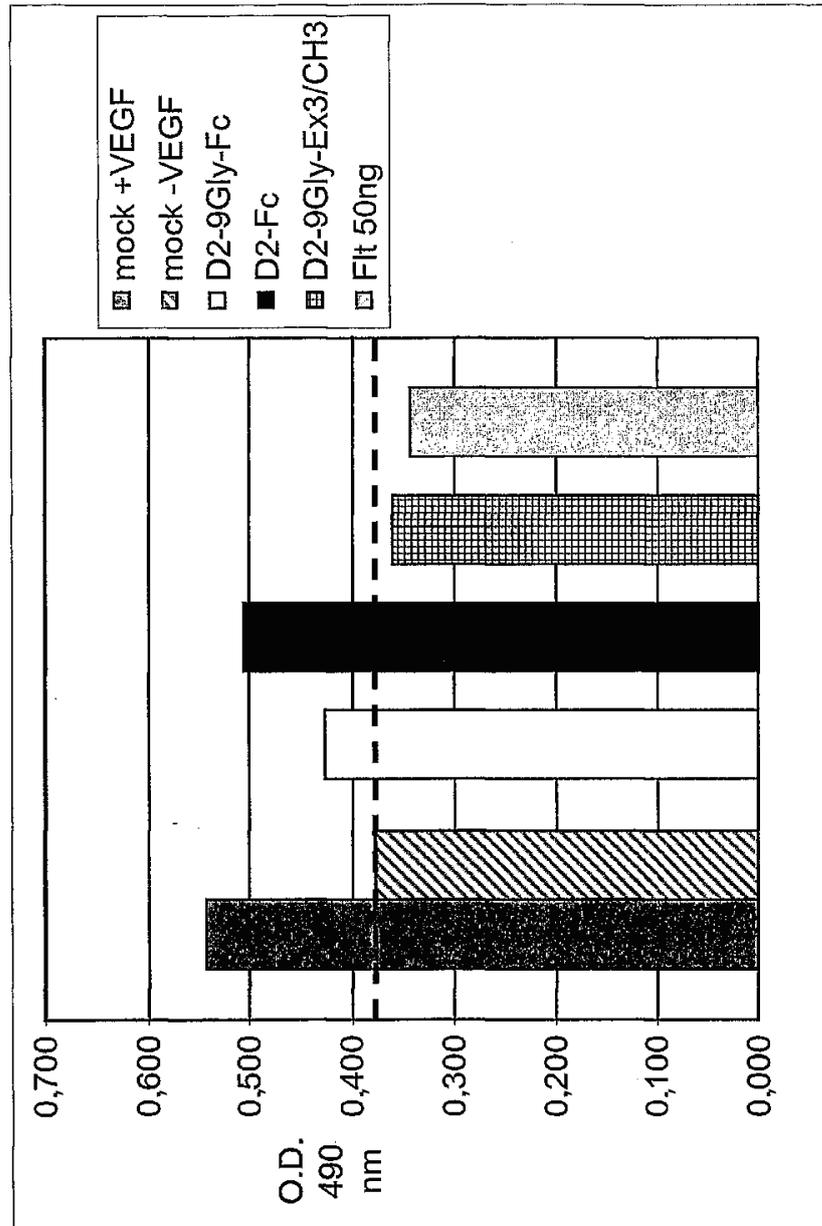


Fig. 5

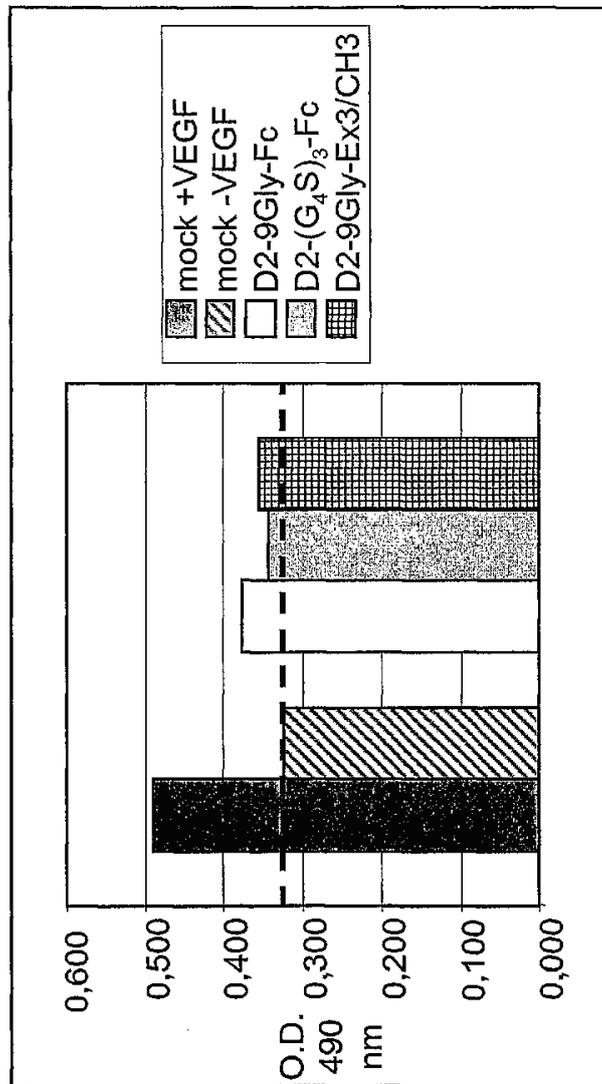


Fig. 6

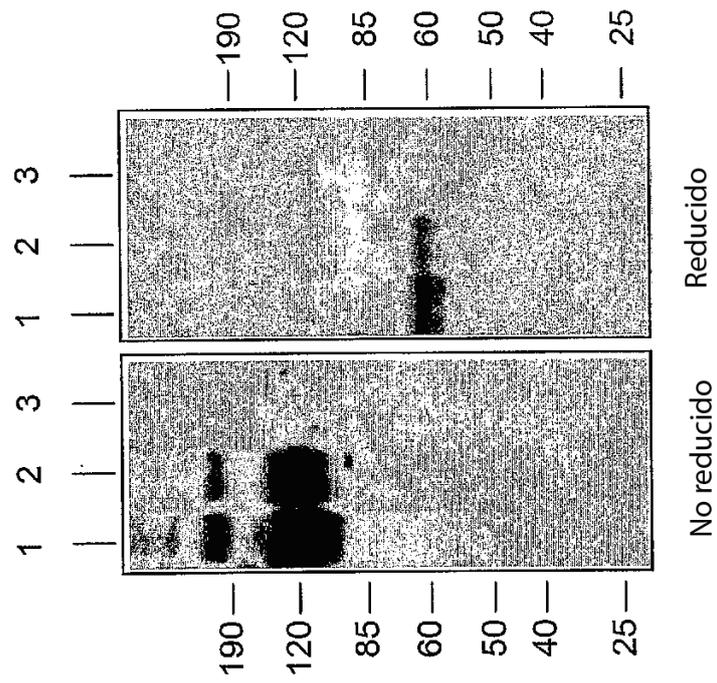


Fig.7

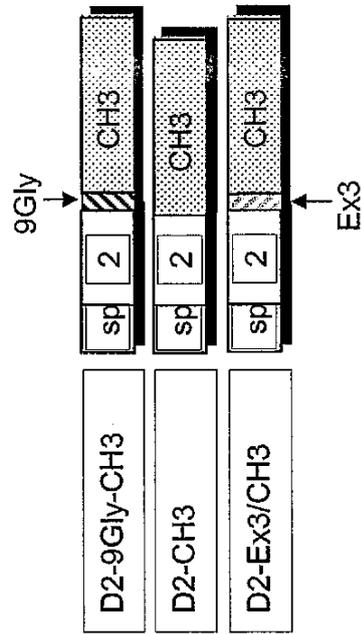


Fig. 8

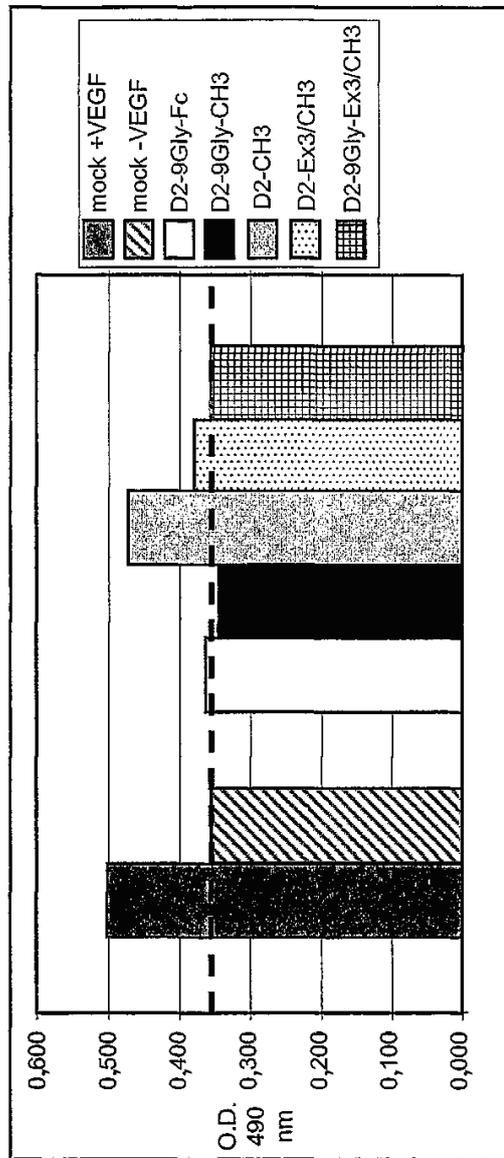


Fig. 9

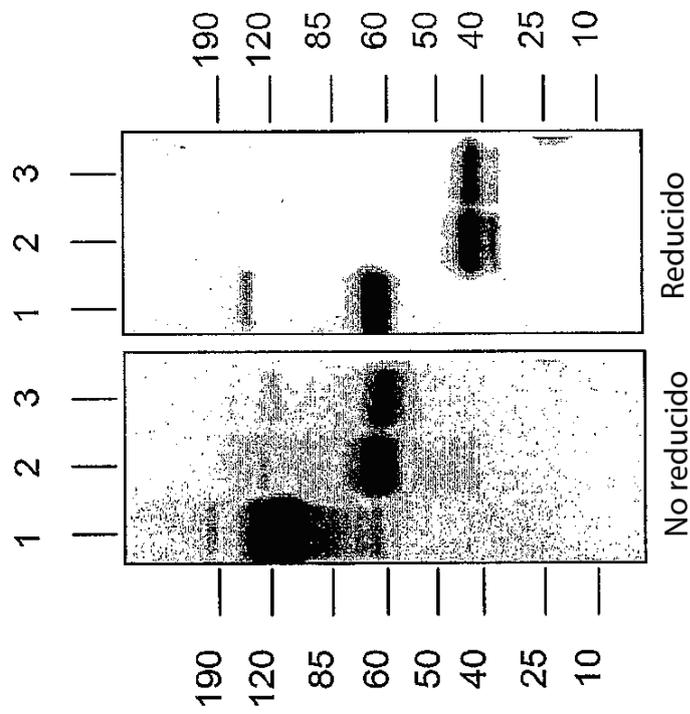


Fig.10

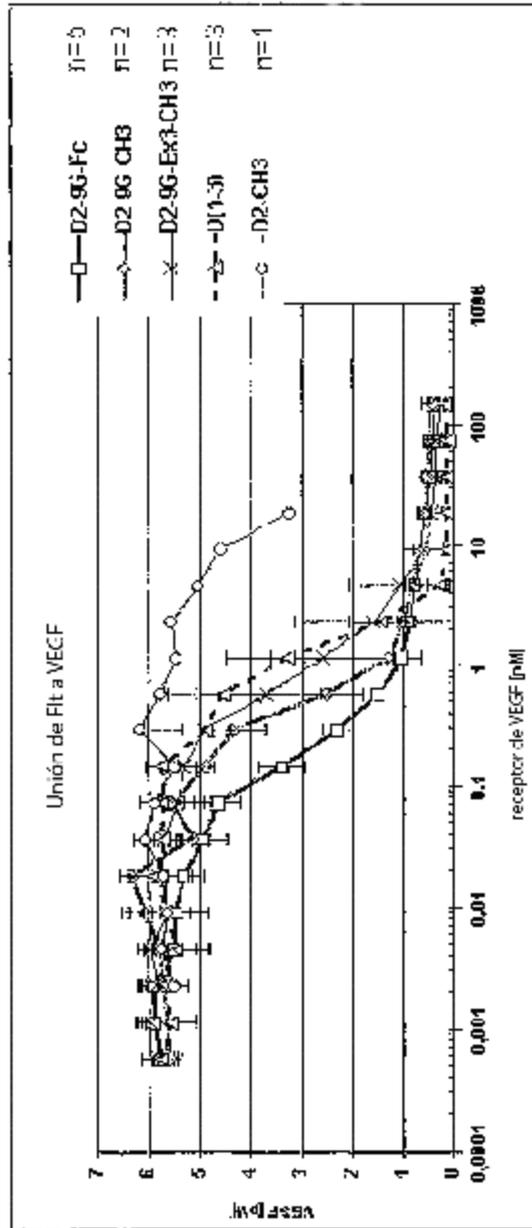


Fig. 11

Cinética de unión BIAcore para moléculas sFlit-1

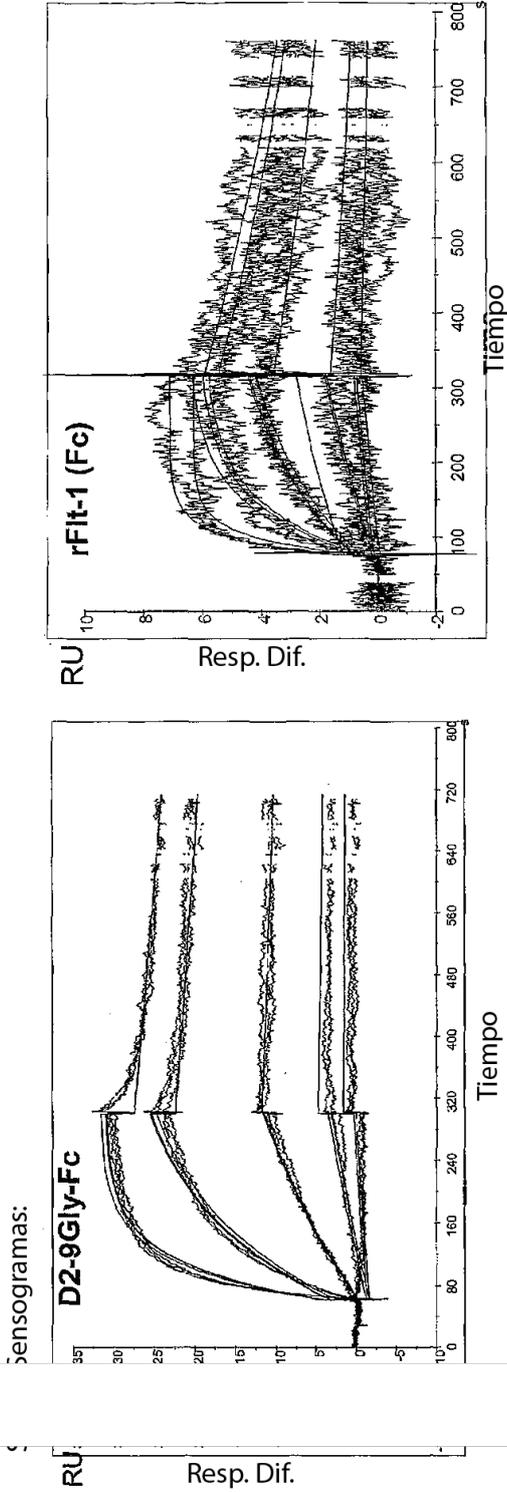


Tabla:

molécula sFlit-1	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	K_D (nM)
D2-9Gly-Fc	1,44e6	3,15e-4	2,19e-10
rFit-1(Fc)(R&D)	2,71e6	1,22e-3	4,48e-10

La cinética de unión del Flit-1 soluble se midió por resonancia de plasmón superficial con un instrumento BIAcore. Se inmovilizó sFlit-1 sobre un chip detector, y se inyectó VEGF165 a concentraciones que variaban de 0,2 a 15 nM. Los sensogramas se evaluaron usando el programa BIA Evaluation, se determinaron las constantes de velocidad K_a y K_d y se calculó la constante de disociación (K_D) a partir de la proporción $K_d/K_a = K_D$. Un menor valor de K_D significa mejor afinidad.

FIG. 12

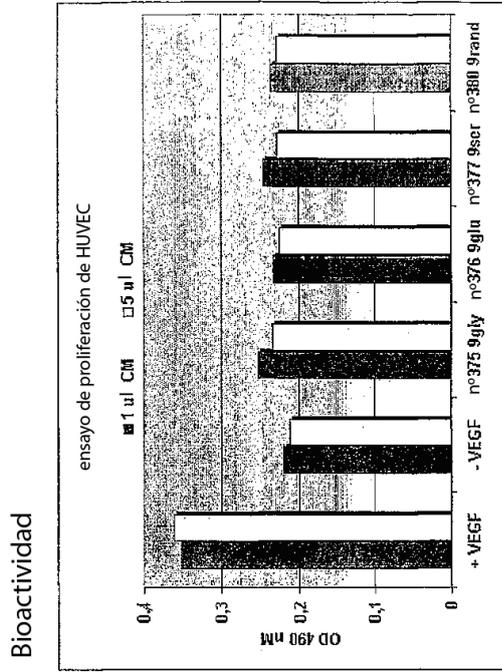


FIG 13 B

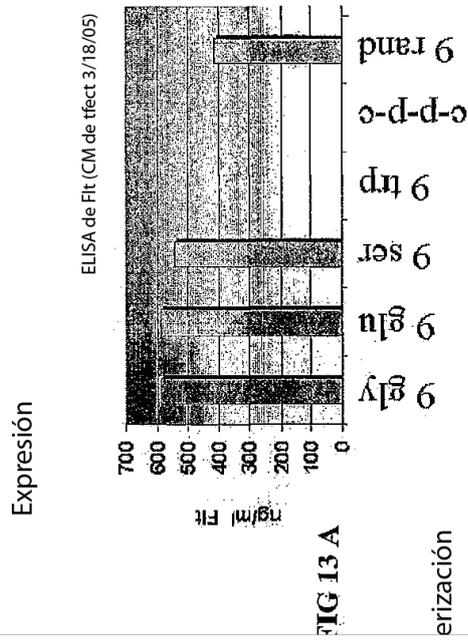


FIG 13 A

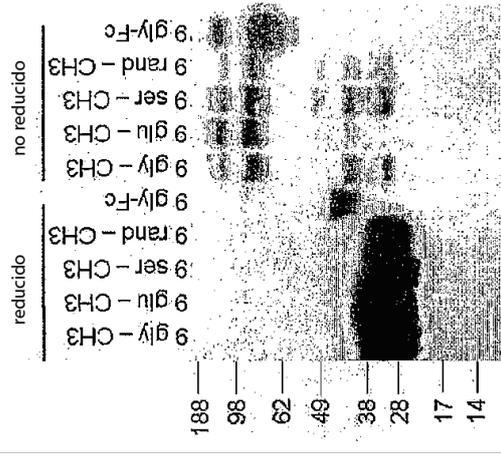


FIG 13 C

Modelo de ratón de OIR

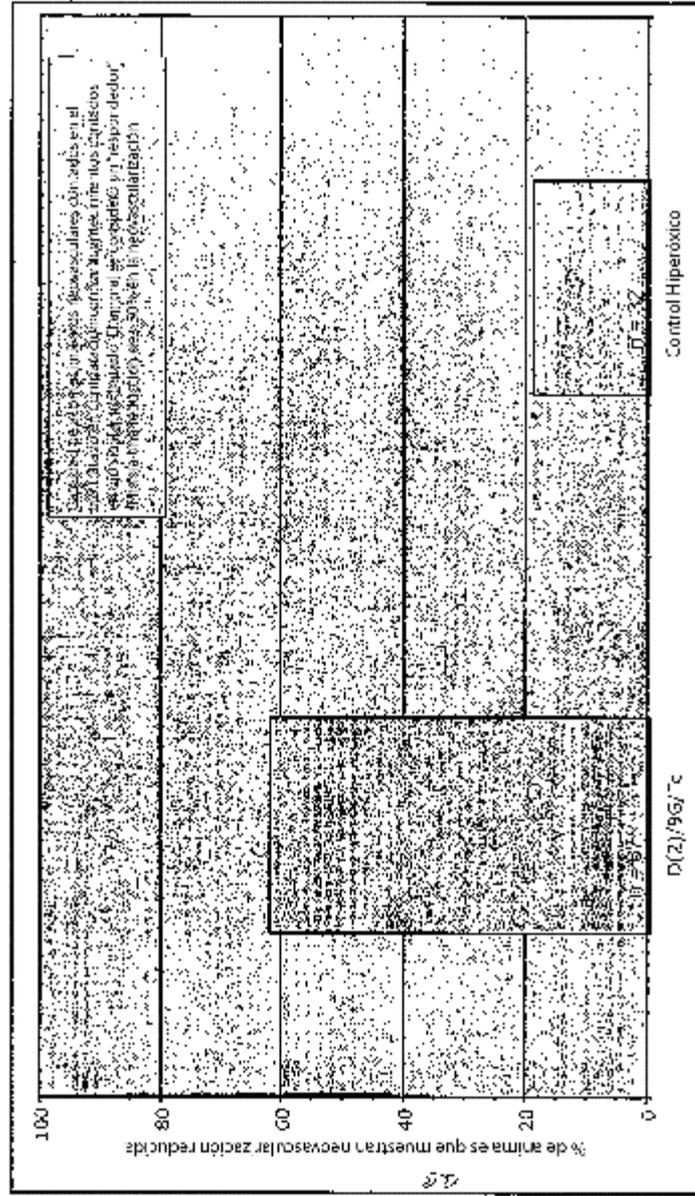


FIG 14