

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 753**

51 Int. Cl.:

C12N 15/18 (2006.01) **C07K 14/495** (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

C07K 1/22 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

G01N 1/34 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2008 E 08733651 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2013 EP 2140005**

54 Título: **Proteínas de fusión que comprenden dos dominios de unión TGF-β**

30 Prioridad:

19.03.2007 US 907059 P

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

21.03.2014

73 Titular/es:

**NATIONAL RESEARCH COUNCIL OF CANADA
(100.0%)
1200 MONTREAL ROAD
OTTAWA, ON K1A 0R6, CA**

72 Inventor/es:

**O'CONNOR-MCCOURT, MAUREEN D.;
SULEA, TRAIAN;
ZWAAGSTRA, JOHN C. y
BAARDSNES, JASON**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

ES 2 449 753 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

Proteínas de fusión que comprenden dos dominios de unión TGF-β

- 5 Campo de la invención
- La invención se relaciona con el campo de los antagonistas y, más específicamente, con antagonistas de polipéptidos capaces de usar como trampas de ligando multivalente de una sola cadena.
- 10 Antecedentes de la invención
- Muchos procesos biológicos indeseables se producen a través de la unión del ligando a receptores de superficie celular. Por lo tanto, a veces es deseable contar con compuestos y métodos para reducir o modular dicha unión.
- 15 La superfamilia TGF-β incluye un número de ligandos de significado biológico.
- TGF-β y activina desempeñan papeles críticos patógenos en muchas enfermedades que incluyen la progresión del cáncer y la fibrosis no controlada y la cicatrización de los tejidos, por ejemplo, enfermedades renales, pulmonares y fibrosis hepática. Además, la miostatina/GDF8 es otro ligando que se relaciona con la activina y que comparte la unión al mismo receptor Tipo II (ActivinRIIb). La miostatina es un potente inhibidor del crecimiento del músculo esquelético y es un objetivo terapéutico validado para las enfermedades de pérdida de músculo tal como la distrofia muscular. Las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que son otros ligandos en la familia TGF-β, se han implicado en las enfermedades cardiovasculares. Por ejemplo, altos niveles de BMP2 y BMP4 se encontraron en placas ateroscleróticas calcificadas y válvulas aórticas enfermas.
- 20
- 25 Agentes principales que se dirigen a estos ligandos son trampas/antagonistas del ligando que se unen y secuestran el ligando. Dos ejemplos son: 1) anticuerpos anti-ligandos y 2) ectodominios del receptor solubles.
- Se han hecho esfuerzos para identificar métodos para reducir la unión del ligando al atrapar el ligando y prevenir su interacción con los receptores de la superficie celular. La inhibición de ciertos ligandos se informó por medio del uso de anticuerpos anti-ligando que atrapan y neutralizan el ligando directamente. Para las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico, sin embargo, los anticuerpos son problemáticos, debido particularmente a los problemas derivados de su inmunogenicidad (y el peligro de la respuesta inmune adversa en los pacientes) y su gran tamaño (la restricción de su capacidad de alcanzar objetivos fuera de la corriente sanguínea).
- 30
- 35 Versiones solubles de ectodominios del receptor antagonizan los ligandos directamente al unirse a ellos y evitar que interactúen con receptores de la superficie celular. En el caso de TGF-β, en modelos animales, la expresión de un ectodominio (ED) del receptor TGF-β tipo de II (TβRII) restauró parcialmente la inmunidad del huésped y promovió el aclaramiento del tumor, lo que indica que la neutralización de TGF-β mediada por el ectodominio del receptor inhibe la progresión tumoral. Se ha demostrado, sin embargo, que la eficacia de TβRII monovalente para antagonizar TGF-β es menor de lo que pudiera desearse. Los intentos para superar esto condujo a la producción de una forma dimerizada artificialmente de versiones de TβRII-ED, dimerizadas, a través de la fusión de cualquiera de los dominios superenrollados o el dominio Fc de IgG. Esta dimerización mejoró el efecto antagonista.
- 40
- 45 Las trampas/neutralizadores basadas en receptores bivalentes que antagonizan la actividad del ligando multimérico tienen el potencial de actuar como agentes terapéuticos o de diagnóstico (de imágenes o no imágenes) para enfermedades/trastornos causados por la sobre-producción/actividad del ligando objetivo. Se demostró que la dimerización no covalente de TβRII-ED (por ejemplo, a través de la fusión para heterodimerizar filamentos helicoidales (TβRII-ED superenrollado)), mejora en gran medida la potencia antagonista de TβRII-ED (De Crescenzo y otros, 2004, J. Biol. Chem. 279: 26013).
- 50
- 55 Una desventaja significativa del dímero fusionado superenrollado es que la naturaleza no covalente del dominio de dimerización limita su potencia, es decir, se disocia a bajas concentraciones de tal manera que una gran parte del ectodominio del receptor helicoidal-fusionado actuará como un monómero en lugar de un dímero. El uso del dominio Fc de IgG proporciona una interacción covalente, pero a costa de gran tamaño y aumento de la probabilidad de inmunogenicidad.
- Breve descripción de las figuras

- Figura 1A.** Modalidades representativas de secuencias de aminoácido correspondientes a regiones intrínsecamente no estructuradas en las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF- β seleccionados.
- Figura 1B.** Modalidades representativas de secuencias de aminoácido correspondientes a regiones de dominio de unión de ligandos estructurados en las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF- β seleccionados.
- 5 **Figura 2A.** Ejemplos representativos de modalidades de ectodominios de receptores fusionados en línea como trampas de una sola cadena homo bivalente de varios factores de crecimiento de la familia TGF- β . El signo "/" indica el punto de fusión.
- Figura 2B.** Ejemplos representativos de secuencias correspondientes a enlazadores naturales de modalidades de trampas de una sola cadena homo bivalente resultantes de la fusión de todas las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF- β seleccionados.
- 10 **Figura 2C.** Ejemplos representativos de secuencias correspondientes a modalidades de enlazadores artificiales para trampas de una sola cadena homo bivalente a diferentes identidades de secuencias con las secuencias enlazadoras naturales.
- Figura 2D.** Ejemplos representativos de secuencias correspondientes a diferentes longitudes del enlazador para modalidades de las trampas de una sola cadena homo-bivalente mediante la supresión o la repetición de secuencias naturales, o mediante la inserción de secuencias artificiales, en la secuencia enlazadora natural.
- 15 **Figura 3.** Representa una ilustración de una modalidad de la construcción de la trampa de una sola cadena (T β R-II)² en un modelo de mecánica molecular tridimensional de la trampa de una sola cadena (T β R-II)² unida al factor de crecimiento TGF- β 3. Se proporcionan dos vistas rotadas 90°.
- Figura 4.** Representa diagramas relacionados con la factibilidad de modalidades específicas de construcciones de trampas con enlazadores naturales a partir de modelos estructurales tridimensionales. Se muestran enlazadores naturales con energía mecánica molecular minimizada para modalidades de trampa de una sola cadena homo-bivalente (T β R-II)², (ActR-IIb)² y (BMPR-Ia)² en complejo con los factores de crecimiento TGF- β 3, Activina y BMP-2, respectivamente. Cada dímero covalente de factor de crecimiento se representa en gris. Cada trampa de una sola cadena se representa en negro, y consiste de dos dominios de unión plegados y del enlazador no estructurado de intervención. Cada punto indica el punto de fusión en la región enlazadora entre dos ectodominios del receptor para generar la trampa de una sola cadena. Las puntas de flecha indican la dirección de la cadena polipeptídica en el enlazador de la trampa. Se proporcionan dos vistas rotadas 90° para cada complejo.
- 20 **Figura 5A.** Representa el modelo de dinámica molecular (MD) para una modalidad de la trampa de una sola cadena homo-bivalente (T β R-II)² unida al factor de crecimiento TGF- β 3 (imágenes de la derecha). Además se muestra para referencia un modelo inicial con enlazador de energía minimizada y con dominios de unión de ligando en posiciones cristalográficas unidas al factor de crecimiento (imágenes de la izquierda, ver además las Figuras 3 y 4). La trampa de una sola cadena se representa en negro y el dímero covalente del factor de crecimiento se representa en gris. Se superponen diez estructuras promediadas en el tiempo (cada una durante 1 ns) que cubren el plazo de 10 ns de la simulación MD. Se proporcionan dos vistas rotadas 90°.
- 25 **Figura 5B.** es una representación gráfica de las fluctuaciones de la raíz cuadrada media por residuo (RMS) de una modalidad del complejo (T β RII)² / TGF- β 3, promediado en el tiempo durante los últimos 10 ns de simulación MD.
- Figura 5C.** es una representación gráfica de la energía de interacción solvatada (SIE) entre una modalidad de una trampa de una sola cadena (T β RII)² y el ligando TGF- β 3 durante los últimos 10 ns de simulación MD de sus complejos, con un valor promedio de -25.4 kcal/mol.
- 30 **Figura 6.** Representa un esquema de modalidades de prototipo de trampas (T β RII)² y N-His (T β RII)² modificada.
- Figura 7A.** Representa los sensoqramas del biosensor basado en la resonancia de plasmón superficial (SPR) (Biacore™) que muestra una modalidad de un prototipo (T β RII)² (en medio condicionado diluido a partir de diferentes % de las transfecciones) unido al ligando TGF- β 3 inmovilizado en la superficie.
- 35 **Figura 7B.** Representa los sensoqramas de resonancia de plasmón superficial en comparación con la unión de modalidades del prototipo bivalente (T β RII)², el T β RII-Fc bivalente y el T β RII monovalente a 270 RUs del ligando TGF- β 3 inmovilizado a la superficie.
- Figura 8.** es una representación fotográfica de un gel que muestra la producción y purificación de alto nivel de rendimiento de una modalidad de la proteína N-His (T β RII)² a partir de 500 ml de cultivo de las células 293 transfectadas.
- 40 **Figura 9A.** Es una representación gráfica de la inhibición de la señalización de TGF- β en las células reporteras de luciferasa Mv1Lu por una modalidad del prototipo (T β RII)² en comparación con el T β RII-Fc.
- Figura 9B.** es una representación gráfica de la determinación basada en SPR de la unión de la trampa de TGF- β en solución por una modalidad del prototipo (T β RII)² y T β RII-Fc en comparación con T β RII-ED monomérico.
- Figura 9C.** Es una representación gráfica de la inhibición de la invasión de células 4T1 inducida por TGF β 1 *in vitro* por una modalidad del prototipo de trampas (TPRII)² y T β RII-Fc.
- 45 **Figura 10A.** es un sensograma de Biacore™ que muestra la unión directa de las modalidades de N-His (T β RII)² y N-His T β RII monomérico a diferentes isoformas de TGF- β .
- Figura 10B.** es una representación gráfica de una comparación de Biacore™ del desempeño de las modalidades de 100 nM de N-His (T β RII)² y T β RII-Fc para unirse a 500 RUs cada uno de TGF- β 1 o TGF- β 3

Figura 10C. es una representación gráfica de la determinación basada en SPR de IC50 para la unión de la trampa a TGF- β 1 (5 nM) en solución. El gráfico muestra la unión eficiente de TGF- β 1 por una modalidad de una trampa N-His (TORII)² y la trampa T β RII-Fc vs la unión reducida por el T β RII monomérico (producido en células 293 o producido en E.coli).

Figura 10D. Es una representación gráfica que muestra la inhibición eficiente de la señalización de TGF- β en las células reporteras de luciferasa Mv1Lu por una modalidad de N-His (T β RII)² y T β RII-Fc en comparación con la pobre inhibición por el T β RII monomérico (producido en células 293 y producido en E.coli).

Figura 11. (A) es una representación fotográfica y (B) es una representación gráfica de los resultados que muestran que una modalidad de N-His (T β RII)² exhibe estabilidad a largo plazo y actividad en 10% de suero a 37°C

Figura 12. Proporciona la representación gráfica que muestra la neutralización eficaz de TGF- β 1 (A) y unión de TGF- β 1 en solución (B) por una modalidad de una trampa (T β RII)² (agente de unión de ligando) que tiene un enlazador de 60 aminoácidos.

Figura 13. Es una representación gráfica que muestra la inhibición eficaz de la señalización de la miostatina en las células A204 por una modalidad de una trampa (ActRIIB)² (agente de unión de ligando) en comparación con la inhibición menos potente de ActRIIB-Fc y ActRIIB monomérico.

Figura 14. Es una representación gráfica de los resultados que muestran que una modalidad de una trampa (BMPR1a)² bivalente (agente de unión de ligando) es más potente que la trampa BMPR1a monovalente para la neutralización de BMP2.

Figura 15A. Proporciona diagramas esquemáticos que ejemplifican modalidades de fusiones en línea de ectodominios de receptores que conducen a modalidades de trampas de una sola cadena heterovalente de factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β .

Figura 15B partes 1 y 2. Representan modalidades de secuencias de aminoácido que ejemplifican modalidades de trampas de una sola cadena heterovalente (agentes de unión de ligando) de factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β , y correspondiente a los diagramas de organización de dominio representados en la Figura 15A.

Resumen de la invención

La invención se refiere a agentes de unión de ligando capaces de permitir la modulación de la respuesta celular a los miembros de la superfamilia TGF- β mediante la unión de uno o más miembros de la superfamilia TGF- β y la prevención de la interacción con receptores celulares, y métodos de diseño y uso de tales agentes. Los agentes de unión de ligando que se enseñan en la presente descripción son preferentemente agentes de unión de ligando multivalentes de una sola cadena. Sin embargo, sería posible enlazar dichas construcciones de una sola cadena a otras moléculas uni-o multivalentes y/o combinar dos o más de tales trampas de una sola cadena por medio del uso de dominios de multimerización conocidos en la materia (por ejemplo, dominios superenrollados, dominios Fc, penta-anticuerpos) para formar una trampa multimérica si así se desea y cualquier trampa que tenga una porción de una sola cadena multivalente cae dentro del alcance de la presente invención.

Los agentes de unión a ligando de la invención son trampas de ligandos multivalentes, que tiene dos dominios de unión (bd) que reconocen diferentes sitios en (o el mismo sitio de diferentes porciones de) el mismo miembro de la superfamilia TGF- β . Los dominios de unión pueden ser modificados, por ejemplo para facilitar la purificación, siempre que tales modificaciones no reduzcan la afinidad de unión a niveles inaceptables.

Los dominios de unión (bd) de las trampas de ligando se unen preferentemente por una región enlazadora de polipéptido flexible. Este enlazador comprende la sec. con núm. de ident.: 49 o sec. con núm. de ident.:50.

La invención proporciona un agente de unión bivalente de la estructura general II con afinidad por un miembro de la superfamilia TGF- β :



donde:

bd1 y bd2 son los mismos y son dominios de unión al polipéptido con una afinidad por el mismo miembro de la superfamilia TGF- β ; y,

el enlazador comprende la sec. con núm. de ident.: 49 o sec. con núm. de ident.: 50.

Como se usa en la presente descripción "una forma aislada" de un dominio de unión es una forma de ese dominio de unión que actúa como un monómero monovalente.

En algunas modalidades de la invención, el miembro de la superfamilia TGF- β por el cual los dominios de unión (bd) tienen afinidad se selecciona del grupo que consiste de: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, activina β A, activina β B, activina β C, activina β E, proteína morfogénica ósea (BMP) 2, BMP 3, BMP4, BMP 5, BMP 6, BMP 7, BMP 8, BMP 9, BMP 10, BMP 11, BMP 12,

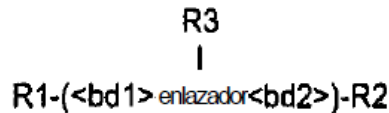
BMP 13, BMP 14, BMP 15, factor de diferenciación de crecimiento (GDF) 1, GDF 3, GDF 8, GDF 9, GDF 15, Nodal, Inhibina α , hormona antimülleriana, Lefty 1, Lefty 2, arteman, persefina y neurturina.

5 En una modalidad de la invención se proporciona un agente de unión en donde bd1 y bd2 se seleccionan de una de la sec. con núm. de ident. 43-48.

De acuerdo con la invención el agente de unión comprende la sec. con núm. de ident.: 49 o sec. con núm. de ident.: 50 como una secuencia enlazadora.

10 Los agentes de unión de ligando descritos en la presente descripción son útiles además en la purificación del ligando, por ejemplo, por inmovilización en una matriz inerte en un soporte sólido, sobre, por ejemplo, de nanopartículas a niveles concentrados del ligando en una muestra.

15 En una modalidad de la invención se proporciona un agente de unión que tiene la estructura general V:



20 en donde R1, R2 y R3 pueden ser iguales o diferentes, pueden no estar presentes y, cuando están presentes, pueden ser independientemente uno o más de una proteína de fusión para el marcaje, un anticuerpo de dominio sencillo, un agente de radioterapia, un agente de imagen, un colorante fluorescente, una etiqueta de la proteína fluorescente, un agente citotóxico para la quimioterapia, un polímero conjugado a fármacos, un agente estabilizante, un fármaco, un nanoportador, un soporte o un dendrímero.

25 Breve descripción de la invención

30 En una modalidad de la invención se proporciona un polipéptido de origen no natural de una sola cadena útil como un agente de unión de ligando. El agente de unión de ligando comprende dominios de unión de ligandos estructurados (denotados bd) derivados de o basado en la porción extracelular de un receptor receptores naturales, unidos por uno o más enlazadores polipéptidos. El agente de unión a ligando proporciona un agente de unión multivalente y no requiere la fusión de cualquiera de las porciones de dimerización o multimerización convencionales tales como dominios superenrollados de dominios Fc para que sean multivalentes.

35 La invención proporciona un agente de unión bivalente de la estructura general II con afinidad por un miembro de la superfamilia TGF- β :



donde:

40 bd1 y bd2 son los mismos y son dominios de unión al polipéptido con una afinidad por el mismo miembro de la superfamilia TGF- β ; y,

el enlazador comprende la sec. con núm. de ident.: 49 o sec. con núm. de ident.: 50.

45 Como se usa en la presente "una forma aislada" de un dominio de unión es una forma de ese dominio de unión que actúa como un monómero monovalente.

50 Enlazadores útiles que no forman parte de la invención se encuentran en las secuencias de aminoácido en sec. con núms. de ident. 53 a 74 que se debe leer convencionalmente con el N-terminal en la izquierda y el C-terminal en la derecha, y en las correspondientes secuencias reversas que tienen los mismos aminoácidos pero en donde el C-terminal está en la izquierda y el N-terminal está en la derecha cuando las secuencias se escriben en su totalidad. En algunas modalidades, tales secuencias reversas se producirán preferentemente por medio del uso de D-aminoácidos. Cuando la inmunogenicidad es motivo de preocupación, por lo general, será deseable detectar dichas secuencias reversas para inmunogenicidad en una

etapa temprana. (Para los ejemplos de secuencias reversas, ver sec. con núms. de ident. 83-91 y sec. con núms. de ident. 93-118 y la secuencia COOH -IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP- NH2 (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 119 en el lista de secuencia) y la secuencia **COOH -IQNLDSMLHGTGMKSDSDQKKESENGVTLAPED NH2** (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 92 en la lista de secuencia) y secuencia **COOH -PVGIPFFDGSIR NH2** (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 12 en la lista de secuencia). Todas las secuencias de aminoácido en este documento se escriben N-terminal a C-terminal a menos que se denote de cualquier otra forma. Todas las secuencias descritas en la presente descripción excepto las sec. con núms. de ident. 83-91 y sec. con núms. de ident. 93-118 y la secuencia COOH -IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP- NH2 (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 119 en la lista de secuencia) y la secuencia **COOH -IQNLDSMLHGTGMKSDSDQKKESENGVTLAPED NH2** (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 92 en la lista de secuencia) y la secuencia **COOH -PVGIPFFDGSIR NH2** (que corresponde a la sec. con núm. de ident. 12 en la lista de secuencia) se describen usando L-aminoácidos y el uso de un D-aminoácido se considera una variante que afecta el porcentaje de identidad de secuencia con las secuencias como se indicó.

En algunos casos, la región de dominio de unión del polipéptido de una sola cadena se seleccionará por su capacidad de unirse a un ligando del factor de crecimiento que tiene una estructura cuaternaria dimérica covalentemente estabilizada, y puede seleccionarse de una lista de factores de crecimiento dentro de la familia TGF-β, por ejemplo, factor de crecimiento transformante beta (TGF-β, proteína morfogenética ósea (BMP), activina, miostatina, e incluyen sus isoformas de origen natural.

En algunos casos, el polipéptido se designa para unirse simultáneamente a sitios equivalentes pero espacialmente distintos en un ligando multimérico. Como se usa en la presente descripción "multimérico" incluye dimérica, trimérica, y números mayores de unidades, y "multivalente" incluye bivalente, trivalente y números mayores de dominios de unión.

En algunos casos, la masa molecular total de los agentes bivalentes descritos en la presente descripción antes de la glicosilación está entre aproximadamente 29 kDa y 37 kDa, y la masa total después de la glicosilación típica está entre aproximadamente 40 kDa y 60 kDa. Así, en la presente descripción se proporcionan trampas de ligando multivalente con un tamaño de pre-glicosilación de entre aproximadamente 12 kDa y 19 kDa por dominio de unión.

Las trampas de ligandos descritos en la presente descripción tendrán generalmente un peso molecular inferior a trampas de ligando multimérico comparables construidas por medio del uso de dominios de multimerización conocidos.

Ejemplos de los tamaños de trampas de ligandos seleccionados

Agente	Previsto para la proteína	Real (con glicosilación) basado en SDS-PAGE
(TβRII) ²	34 kDa	50-60 kDa
(TβRIIb) ²	37 kDa	50-60 kDa
(ActRIIB) ²	30 kDa	50-60 kDa
(BMPRIa) ²	29 kDa	40-50 kDa
RIIEcoil+RIIKcoil		37 Kd+40 kDa = 77 kDa
TβRII-Fc		60 Kd+60 kDa = 120 kDa

Los polipéptidos de la invención pueden ser útiles como agentes terapéuticos que neutralizan la acción de los ligandos diméricos covalentemente estabilizados asociados con la enfermedad tales como factores de crecimiento. Además pueden tener un potencial comercial para su uso como agentes de diagnóstico para detectar la presencia de ligandos diméricos covalentemente estabilizados asociados con la enfermedad tales como factores de crecimiento en aplicaciones de diagnóstico sin imágenes o con imágenes. Además pueden ser útiles en la purificación y/o concentración o la segregación de ligando *in vitro*.

Descripción detallada de la invención

Aunque la invención se describe con referencia a ejemplos específicos, se entenderá que no se limita por eso.

Experimento #1: Estrategia de diseño de trampas bivalentes de una sola cadena para ligandos de la familia TGF-β

1. Se diseñaron trampas recombinantes de una sola cadena contra factores de crecimiento que pertenecen a la superfamilia del factor de crecimiento TGF- β de las citocinas con nudo de cisteína de acuerdo con SCOP (Andreeva y otros, 2008, Nucl. Acid Res. 36: D419) y Pfam (Finn y otros, 2006, Nucl Acid Res. 34: D247) clasificaciones estructurales. Más específicamente, estos factores de crecimiento que incluyen, por ejemplo, TGF- β s, activinas y BMPs, comparten la misma arquitectura 3D y forman homodímeros unidos por disulfuros covalentes. El método descrito en la presente descripción es aplicable a todos los miembros de la superfamilia TGF- β , que incluye TGF- β 1, β 2, - β 3; activina β A, β a, β C, β E; proteínas morfogenéticas óseas (BMP) 2-15; factores de diferenciación de crecimiento (GDF) 1, 3, 8 (miostatina), 9 y 15; Nodal; Inhibina α ; hormona antimülleriana (AMH); Lefty 1 y 2; Arteman, persefina y neurturina.

2. Las trampas recombinantes de una sola cadena contra los factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β se diseñaron a partir de la porción extracelular de sus receptores afines naturales. El segmento extracelular de todos estos receptores de la superfamilia TGF- β contienen un dominio sencillo estructurado que pertenece a la familia de toxina de serpientes de acuerdo con SCOP (Andreeva y otros, 2008, Nucl. Acid Res. 36: D419) y Pfam (Finn y otros, 2006, Nucl Acid Res.34: D247) clasificaciones estructurales. La porción extracelular completa de estos receptores incluye típicamente segmentos no estructurados que flanquean sus dominios de unión a ligando plegado. Estas porciones extracelulares no estructuradas fueron evidentes a partir de las estructuras 3D determinadas experimentalmente disponibles de la base de datos PDB (Berman y otros, 2000, Nucl. Acid Res. 28: 235), por ejemplo, estructuras cristalinas para el ectodominio del receptor de TGF- β tipo II (Hart y otros, 2002 Nat. Struct. Biol. 9: 203; Boesen y otros, 2002, Structure 10: 913; Groppe y otros, 2008, Mol. Cell 29: 157), ectodominio del receptor de TGF- β tipo I (Groppe y otros, 2008, Mol. Cell 29:157), ectodominio del receptor de activina tipo IIa (Allendorph y otros, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 7643), ectodominio del receptor de activina tipo IIb (Thompson y otros, 2003, EMBO J. 22: 1555; Greenwald y otros, 2004, Mol. Cell 15: 485), ectodominio del receptor de BMP tipo 1 (Kirsch y otros, 2000, Nat. Struct. Biol. 7: 492), o la estructura NMR del ectodominio del receptor de TGF- β tipo II (Deep y otros, 2003, Biochemistry 42: 10126)]. En ausencia de datos experimentales, como por ejemplo en el caso de la región extracelular de la variante de empalme IIb del receptor tipo II del TGF- β , los segmentos extracelulares no estructurados se definieron por: (i) porciones de secuencia en su defecto fuera de los límites de los dominios de unión de ligandos plegados situados por análisis comparativo contra los homólogos caracterizados estructuralmente, y (ii) las predicciones basadas en los algoritmos basados en el conocimiento, por ejemplo, DISOPRED (Ward y otros, 2004, J. Mol. Biol. 337: 635). Las secuencias de aminoácido que corresponden con las regiones no estructuradas (es decir, flexibles) y estructuradas (es decir, plegadas, dominio de unión- ligando) de los ectodominios de muchos receptores de los factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β , se dan en las **Figs. 1A y 1B**, respectivamente.

3. Las trampas recombinantes de una sola cadena homo-bivalente de este modo designadas contra los factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β descritos en la presente descripción se diseñaron con respecto al modo de unión determinado experimentalmente entre ligandos de la familia TGF- β y la porción extracelular de sus receptores afines naturales. El modo de unión de ligando-receptor se proporcionó a nivel atómico por las estructuras 3D de alta resolución disponibles para muchos miembros de la ligandos de la superfamilia TGF- β en complejo con sus ectodominios del receptor afin. Los ejemplos de estructuras moleculares experimentales para los complejos superfamilia TGF- β -factor de crecimiento/ectodominio del receptor incluye la unión de TGF- β 3 a T β R-II-ED (Hart y otros, 2002 Nat. Struct. Biol. 9: 203), activina unida a ActR-IIb-ED (Thompson y otros, 2003, EMBO J. 22: 1555; Greenwald y otros, 2004, Mol. Cell 15: 485), BMP-2 unida al ectodominio del receptor BMP tipo la BMPR-Ia-ED (Kirsch y otros, 2000, Nat. Struct. Biol. 7: 492) y ActR-IIa-ED (Allendorph y otros, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 7643), BMP-7 unida a ActR-IIa-ED (Greenwald y otros, 2003, Mol. Cell 11: 605). Estas estructuras proporcionan la orientación espacial relativa entre dos cadenas del ectodominio del receptor separadas (moléculas) que se unen de forma simultánea en una molécula de ligando covalentemente homodimerizada, es decir, estequiometría receptor:ligando 2:1. Los conjuntos de ligando-receptor de orden superior entre un factor de crecimiento de la superfamilia TGF- β particular y los ectodominios de diferentes tipos de receptores también se han determinado, por ejemplo, los complejos ternarios entre TGF- β 3, T β R-II-ED y TPR-I-ED (Groppe y otros, 2008, Mol. Cell 29:157) o entre BMP-2, ActR-IIa-ED y BMPR-Ia-ED (Allendorph y otros, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 7643). Estas estructuras proporcionan la orientación espacial relativa entre cuatro cadenas de ectodominio del receptor separadas (moléculas) que se unen simultáneamente en una molécula ligando covalentemente homodimerizada, es decir, estequiometría receptor-alta-afinidad:receptor-baja-afinidad:ligando 2:2:1. Tales estructuras se usaron como guías para diseñar trampas de una sola cadena hetero-bivalente, hetero-trivalente y hetero-tetravalente de factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β y son útiles en el diseño de las trampas de una sola cadena para otros ligandos adecuados de interés que implican la superfamilia TGF- β .

4. Las trampas de una sola cadena homo-bivalente de ligandos de la familia TGF- β por lo tanto se diseñaron como proteínas de fusión no naturales que consisten en la secuencia (que excluye el péptido señal) de la porción extracelular natural del receptor repetida dos veces. **La Figura 2A** presenta esquemáticamente trampas de una sola cadena homo-

bivalente con enlazadores naturales para tres ligandos de la familia TGF- β , donde las regiones estructuradas y no estructuradas se basan en datos experimentales para porciones extracelulares de un solo dominio, como se presentan en las Figuras 1A y 1B. Esto resultó en construcciones con dos dominios estructurados para unir al ligando(s) de la superfamilia TGF- β seleccionado, espaciado por un enlazador flexible no estructurado formado mediante la fusión del C-terminal no estructurado del primer dominio al N-terminal no estructurado del segundo dominio. El enlazador natural además se sustituyó progresivamente por secuencias artificiales así como se varió en longitud (Figuras 2B-D). A partir de consideraciones termodinámicas y cinéticas, se esperaba que los ectodominios de receptores divalentes proporcionarían afinidades de unión de ligandos aumentadas y tasas de disociación del ligando más lentas con respecto a ectodominios del receptor de una sola cadena.

Experimento #2: Procedimiento de evaluación de factibilidad para trampas bivalentes de una sola cadena

En la medida en que se conservan las estructuras de diversos factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β , las estructuras de sus ectodominios de receptor aún se conservan, y la estequiometría 2:1 de unión ligando-receptor se conserva, el concepto de fusionar dos secuencias ectodominio del receptor natural para producir trampas homo-bivalentes de una sola cadena de afinidad de unión a ligando *in vitro* y actividad celular neutralizante del ligando mejoradas, en relación con los respectivos ectodominios del receptor monovalente, es aplicable a toda la familia TGF- β . La factibilidad de estas trampas de ligando puede evaluarse teóricamente rutinariamente siguiendo el procedimiento paso a paso que se describe más abajo. Aunque el procedimiento se presenta para las trampas de una sola cadena homo-bivalente, además se aplica a otros diseños cubiertos aquí, por ejemplo, trampas de una sola cadena hetero-bivalente y hetero-tetravalente.

1. La distancia lineal se mide entre el átomo de carbono de la cadena principal C-terminal de un dominio y el átomo de nitrógeno de la cadena principal N-terminal del otro dominio cuando se une al ligando dimerizado covalentemente. Las estructuras alternativas del complejo que reflejan la flexibilidad geométrica interna en el modo de homodimerización del ligando disulfuro estabilizado cuando se une a los receptores de ectodominios, como se informó en varios casos (Greenwald y otros, 2004, Mol. Cell 15: 485), puede incluirse en el proceso de diseño. Un ordenador equipado con un software comercial/público adecuado para la manipulación de estructuras moleculares en un dispositivo de gráficos disponible puede emplearse habitualmente para este fin.

2. La distancia lineal (en unidades Å, $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$) se divide por un factor de 2.5 para calcular el número mínimo de residuos de aminoácidos que el enlazador flexible debe poseer (Tabla 1) con el fin de permitir la unión simultánea de los dominios plegados a sus sitios de unión en el ligando homodimérico. El factor 2.5 se basa en la extensión C α -C α de enlazadores totalmente extendidos, que tiene el máximo a 3.0 Å (George y Heringa, 2002, Protein Eng. 15: 871), menos una tolerancia promedio de 0.5 Å por residuo de aminoácido para permitir desviaciones de la trayectoria del enlazador a partir de la linealidad.

(Tabla 1. Características del enlazador para ejemplos selectos de trampas de una sola cadena de factores de crecimiento de la familia TGF- β . El número mínimo de residuos requeridos para el enlace representa la distancia lineal basada en la estructura para el enlace (Å) dividido por un factor de 2.5.)

3. El número de residuos de aminoácidos en la porción del enlazador no estructurada de la trampa de una sola cadena bivalente debe ser al menos igual al número mínimo estimado de residuos del enlazador requerido. Las isoformas del receptor que difieren en la longitud de los segmentos no estructurados extracelulares, tales como las isoformas II y IIb del receptor de TGF- β (Figura 2B), se pueden incluir en el proceso de diseño. El enlazador basado en la secuencia natural además se puede acortar hasta el número mínimo estimado de residuos de aminoácidos sin perjudicar significativamente la afinidad de unión de ligando y la actividad neutralizante de la trampa. Un lugar preferible para acortar el enlazador no estructurado es a partir del punto de fusión (ver la Figura 3) en cualquiera o en ambas direcciones con respecto a la secuencia de aminoácidos. Ejemplo de enlazadores naturales acortados que se pueden utilizar en el diseño de trampas de una sola cadena se dan en la Figura 2D. Tal como se enumera en la Tabla 1, la longitud mínima requerida del enlazador varía entre diversas trampas de una sola cadena de factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β . Un límite superior para la longitud del enlazador no estructurado no está definido. Por lo tanto, las construcciones de agentes de unión de ligandos (trampa) con enlazadores que comprenden segmentos de secuencia no estructuradas repetidas en su totalidad o en parte se prevén para cumplir con el diseño bivalente y preservar las características deseadas de la trampa. El enlazador natural se puede sustituir progresivamente por secuencias artificiales, que puede o no puede dar lugar a diferentes longitudes del enlazador. Ejemplos de enlazadores más largos que el enlazador natural diseñado mediante la repetición de la secuencia natural o mediante la introducción de la secuencia artificial se dan en la Figura 2D.

4. Finalmente, el análisis teórico a nivel atómico se llevará a cabo, cuando se modele el enlazador entre los dominios estructurados y la estructura molecular del complejo trampa-ligando se refina mediante la reducción al mínimo de la energía mecánica molecular y mediante la realización de simulaciones de dinámica molecular (Cornell y otros, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 5179). Esto puede, en algunos casos, destacar regiones de incompatibilidad estérica y/o electrostática entre los enlazadores de la trampa y el factor de crecimiento, y sugerir que la longitud y/o la composición del enlazador puede ser incompatible con el diseño bivalente, aun si el enlazador cumple con el número mínimo de requerimiento de aminoácidos según la etapa (3.) anterior. Si el enlazador se puede acomodar sin afectar la unión simultánea de los dominios estructurados a sus sitios de unión en el ligando, entonces la construcción de la trampa se considera factible para la aplicación propuesta. El ordenador equipado con un software comercial/público adecuado para la manipulación de las estructuras moleculares en un dispositivo de gráficos disponible, y para realizar el cálculo de energía y de simulación basado en campos de fuerza mecánica molecular, por ejemplo, el campo de fuerza AMBER (Cornell y otros, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 5179), alguien con experiencia en la materia lo puede emplear rutinariamente con el fin de llevar a cabo este análisis de modelación estructural. Un análisis de modelación molecular detallada de la trampa de una sola cadena homo-bivalente ($T\beta R-II$)² se proporciona como ejemplo en la siguiente sección e incluye la simulación de dinámica molecular. Ejemplos de modelos refinados de energía mecánica molecular de tres trampas homo-bivalentes de una sola cadena: ($T\beta R-II$)², ($ActR-IIb$)² y ($BMPR-Ia$)², unidas a sus respectivos factores de crecimiento se muestran en las Figuras 3 y 4. Estos modelos a nivel atómico representan puntos de partida para la optimización adicional basada en ordenador de la composición y longitud del enlazador.

Este proceso se explica con mayor detalle en el ejemplo más abajo:

Ejemplo A de modelación, Experimento #2

I. En un ejemplo, la solución a nivel atómico de la estructura de la trampa homo-bivalente de una sola cadena ($T\beta R-II$)² se simuló en complejo con el factor de crecimiento TGF- $\beta 3$.

El punto de partida para el diseño molecular de la trampa ($T\beta R-II$)² fue la estructura de resolución 2.15 Å del cristal del complejo TGF- $\beta 3$ humano dímérico enlazado por disulfuro con dos ectodominios del receptor de tipo II de TGF- β (Hart y otros, 2002 Nat. Struct. Biol. 9: 203), depositada en el banco de datos de proteínas (Berman y otros, 2000, Nucl. Acid Res. 28: 235) bajo el código 1KTZ. Debido a que esta estructura muestra el factor de crecimiento en una conformación no canónica probablemente debido al bajo pH usado en las condiciones de cristalización (Hart y otros, 2002 Nat. Struct. Biol. 9: 203; Gropppe y otros, 2008, Mol. Cell 29:157), la estructura del complejo binario primero se reconstruyó con el ligando en la conformación canónica como se informó previamente (Hinck y otros, 1996, Biochemistry 35: 8517; Mittl y otros, 1996, Protein Sci. 5: 1261), que además recientemente se confirmó por la estructura ternaria del ensamble receptor-ligando TGF- β (Gropppe y otros, 2008, Mol. Cell 29:157). Un modelo molecular en 3D inicial de la trampa ($T\beta R-II$)² que incorpora un enlazador natural entre dominios de 35 residuos de aminoácido (según la secuencia enumerada en **la Figura 2B**) se construyó a partir de geometrías estándar seguido por minimización del gradiente de energía del conjugado de la energía del campo de fuerza mecánica molecular por medio del uso de un campo de fuerza de todos los átomos AMBER (Cornell y otros, 1995, J. Am. Chem. Soc. 117: 5179) y el conjunto de programas AMBER 9 (Case y otros, 2005, J Comput. Chem. 26: 1668). Durante minimizaciones de energía, sólo las regiones enlazadoras de las trampas se les permitió moverse, mientras que las coordenadas de los factores de crecimiento y de los dominios plegados de las trampas se fijaron. El modelo molecular 3D resultante de la trampa de una sola cadena homo-bivalente ($T\beta RII$)² unido a TGF- $\beta 3$ se representa en **la Figura 4**.

Este modelo inicial del complejo se usó como entrada para la simulación de la dinámica molecular (MD) llevada a cabo junto con el campo de fuerza AMBER FF03 (Duan y otros, 2003, J. Comput. Chem. 24: 1999; Lee & Duan, 2004, Proteins 55: 620) dentro del conjunto de programas AMBER 9 (Case y otros, 2005; J. Comput. Chem. 26: 1668). El sistema molecular consistente de 245 residuos de aminoácidos de la trampa de una sola cadena (a partir de la trampa ($T\beta R-II$)² de longitud completa con 272 residuos de aminoácido, 21 residuos no estructurados a partir del N-terminal y 6 residuos flexibles a partir del C-terminal no se incluyeron en la simulación MD), 224 residuos de aminoácido del dímero TGF- $\beta 3$ y 14 contraiones Na^+ (se añadieron para mantener la electroneutralidad) se solvató en la caja de agua rectangular por medio del uso del programa Xleap en el software AMBER 9. La distancia entre la pared de la caja y el átomo más cercano del soluto fue de 12.0 Å, y la distancia más cercana entre los átomos de soluto y disolvente fue 0.8 Å. La energía de todo el sistema se redujo al mínimo mediante la aplicación de restricciones armónicas con constantes de fuerza de 10 kcal/mol/Å² para todos los átomos de soluto, seguido por el calentamiento a partir de 100 K a 300 K durante 25 ps en el ensamble canónico (NVT), y mediante el equilibrio para ajustar la densidad del solvente bajo presión de 1 atm durante 25 ps en la simulación del ensamble isotérmico isobárico (NPT). Las restricciones armónicas después se redujeron gradualmente a cero con cuatro rondas de 25 ps de simulaciones NPT. Después de 25 ps adicionales de simulación, una corrida de producción de 15 ns se obtuvo con instantáneas recogidas cada 1 ps: Para todas las simulaciones, se usaron 2 fs de tiempo de la etapa y 9 Å de corte de lo no unido. El método de partículas de malla Ewald

(Darden y otros, 1993, J. Chem. Phys. 98: 10089) se usó para tratar la electrostática de largo alcance, y longitudes de unión que implican a los átomos de hidrógeno se limitaron mediante SHAKE (Ryckaert y otros, 1977, J. Comput. Phys. 23: 327). No se impusieron otras restricciones durante la simulación MD.

Como se ve a partir **la Figura 5A**, la trampa de una sola cadena ($T\beta R-II$)² unida a TGF- β 3 alcanza una estructura de solución MD estable que conserva la unión simultánea de los dos dominios de unión de ligando sobre el factor de crecimiento dimérico como se observa en la estructura cristalina de los ectodominios del receptor sin recubrimiento (Hart y otros, 2002 Nat. Struct. Biol. 9: 203, Groppe y otros, 2008, Mol. Cell 29:157). Esto corrobora la factibilidad de la trampa de TGF- β de una sola cadena diseñada en términos de la longitud del enlazador. El análisis MD además revela que en el complejo, la región enlazadora de la trampa de una sola cadena se vuelve relativamente rígida, con sólo 6 residuos que experimentan una mayor movilidad (expresado como las fluctuaciones de la raíz cuadrada media promediada en el tiempo y por residuo) que el resto de los residuos de aminoácidos de la trampa (**Figura 5B**). Adicionalmente, la trampa de una sola cadena estableció interacción favorable con el factor de crecimiento, como se evaluó por la función de energía de interacción solvatada para calificar la afinidad de unión proteína-ligando (SIE) (Naim y otros, 2007, J. Chem. Inf. Model. 47: 122). Un valor SIE muy favorable de -25.4 kcal/mol se calculó como promedio durante los últimos 10 ns de simulación MD (**Figura 5C**). Esto indica además la factibilidad del enlazador natural empleado en términos de composición de aminoácido, es decir, no hubo contactos estéricos y electrostáticos desfavorables significativos previstos entre el enlazador de la trampa y el factor de crecimiento.

II. En un ejemplo, el diseño basado en la estructura conduce a una molécula divalente consistente de dos ectodominios $T\beta RII$ humanos que se fusionan en tándem en una sola cadena de polipéptido (se muestra esquemáticamente en **la Figura 6**). En esta construcción, una secuencia enlazadora de intervención se forma a partir de la secuencia C-terminal natural no estructurada de un ectodominio (negro, 10 residuos) y la secuencia N-terminal natural no estructurada de otro ectodominio (blanco, 25 residuos). Este enlazador tiende un puente entre los dos dominios de unión de TGF- β estructurados. Esta trampa de TGF- β se denomina de este modo prototipo ($T\beta RII$)². La construcción además contiene una etiqueta myc N-terminal y una etiqueta 6xHis C-terminal para facilitar la detección y purificación de proteínas. En el prototipo ($T\beta RII$)² la secuencia IPP nativa se reemplaza por GGR dentro del enlazador debido a un sitio de restricción NotI insertado durante la construcción del gen ($T\beta RII$)². Además se muestra otra construcción con un enlazador de 35 residuos de aminoácido con IPP nativa restaurada, y que tiene una etiqueta His N-terminal. Esta construcción se denomina "N-His ($T\beta RII$)² modificada" y cuenta con una secuencia enlazadora nativa. Se dan modelos moleculares previstos de ($T\beta RII$)² unido a TGF- β
Figuras 3-5.

Experimento #3: Producción a pequeña escala del prototipo ($T\beta RII$)² y demostración de la actividad de unión de TGF- β

La Figura 6 muestra un prototipo esquemático de ($T\beta RII$)². El prototipo del gen ($T\beta RII$)² se clonó en el vector de expresión de mamífero pTT y cantidades crecientes se transfectaron transitoriamente en las células HEK293. El medio condicionado a partir de estas células transfectadas se recogió después de 5 días y se probó mediante el análisis SPR de Biacore para la unión de ($T\beta RII$)² secretada a una superficie de TGF- β 3 (**Figura 7A**). El sensograma muestra niveles crecientes de unión que se correlacionan con las células transfectadas con niveles crecientes del plásmido ($T\beta RII$)² (que está en el intervalo a partir de 1% a 95% de las células transfectadas), lo que indica un efecto de dosis y de unión específica. Las características de unión de ($T\beta RII$)² (producido a partir de 95% de células transfectadas) se comparó con el $T\beta RII$ -Fc dimerizado y el $T\beta RII$ monomérico (**Figura 7B**). El sensograma del prototipo ($T\beta RII$)² fue similar a la interacción de $T\beta RII$ -Fc (lenta tasa de disociación), y ambos fueron distintos de la interacción de $T\beta RII$ monomérico (rápida tasa de disociación), lo que indica que ($T\beta RII$)² interactúa con la superficie de TGF- β 3 en una manera bivalente de alta afinidad.

Experimento #4: Producción y purificación del prototipo y N-His ($T\beta RII$)² modificado

Escalado de la producción del prototipo ($T\beta RII$)² en las células 293 resultó en rendimientos variables de proteína (1-3 mgs por 1 litro de cultivo) sobre la purificación a través de la columna de cobalto, quizá debido a una etiqueta de His menos accesible en el C-terminal. Se construyó una versión modificada que tenía una etiqueta de His en el N-terminal, denominada N-His ($T\beta RII$)², como se muestra en **la Figura 6**. Las células HEK293 transfectadas con N-His ($T\beta RII$)² se cultivaron en 500 ml de cultivo. El medio se recogió, se concentró 5 veces por filtración en Centricon 10 kDa y después se pasó a través de una columna de 10 ml de Fractogel cobalto. **La Figura 8** muestra un análisis de SDS-PAGE de N-His ($T\beta RII$)² en las diversas etapas de purificación. La N-His ($T\beta RII$)² en las fracciones eluidas (carril 6) está relativamente pura y migra como una mancha (probablemente debido a la glicosilación) en el intervalo de 50-60 kDa. El rendimiento total a partir de 500 ml de cultivo fue de 7-8 mgs, lo que indica que la proteína N-His ($T\beta RII$)² es susceptible a la producción a gran escala.

Experimento #5: Demostración de que ($T\beta RII$)² es una potente trampa de TGF- β

La capacidad del prototipo purificado (T β RII)² para neutralizar TGF- β se probó en las células Mv1Lu que tienen un gen reportero de luciferasa sensible a TGF- β y en comparación con T β RII-Fc a partir de dos fuentes, comercial R&D y el colaborador H. Lin (**Figura 9A**). Las curvas de inhibición resultantes indicaron que la IC₅₀ promedio para el prototipo (T β RII)² es 0.58 nM (S.D. 0.64) que está en el mismo intervalo que para T β RII-Fc de Lin (0.45 nM) y ligeramente mayor que T β RII-Fc de R&D (0.1 nM). El prototipo (T β RII)² purificado además se comparó con el T β RII-Fc dimérico y T β RII-ED monomérico por su capacidad para unir de forma competitiva el TGF- β en solución a través de análisis de Biacore (**Figura 9B**). Cantidades crecientes de cada aglutinante se añadió por separado a una cantidad constante de TGF- β 1 o - β 3 (5 nM) seguido por coinyección de esta mezcla sobre una superficie de anticuerpo específico de TGF- β . El nivel de TGF- β no unido en equilibrio se evaluó por el nivel máximo / meseta de la curva de unión de superficie (**Figura 9B**) el prototipo (T β RII)² y T β RII-Fc tienen IC₅₀s similarmente baja en el intervalo de 5-8 nM, como sería de esperar para la unión de TGF- β divalente, intra-molecular. En contraste, la IC₅₀ para el T β RII-ED monovalente es 10-20 veces mayor. Uno podría predecir, para completa avidez, que IC₅₀ para (T β RII)² dimérico podría ser al menos 100-veces mayor que para el T β RII-ED monomérico. Con el fin de aumentar la avidez, se pueden muestrear longitudes de enlazadores variables para (T β RII)² (ver **las Figuras 2C y 2D**). Estos resultados (**Figuras 9A y 9B**) indican que (T β RII)² es un excelente reactivo de captura / neutralización para el TGF- β y por lo tanto es un buen candidato a agente terapéutico y/o diagnóstico para enfermedades en las que el TGF- β es causal y sobreexpresado/hiperactivo (por ejemplo, tumores de mama). Con este fin se analizó la capacidad del prototipo (T β RII)² para prevenir la invasión de las células de cáncer de mama 4T1 inducida por TGF- β in vitro (**Figura 9C**). Similar al T β RII-Fc, el prototipo (T β RII)² redujo la invasión de las células 4T1 a aproximadamente 20% del (+ TGF- β) control no tratado con trampa.

Experimento #6: Evaluación de las características de unión y eficacia de N-His (T β RII)²

Los dos ensayos diferentes de SPR de Biacore que se utilizaron en la Figura 7 y la Figura 9B se usaron de nuevo para caracterizar la interacción N-His (T β RII)² - ligando TGF- β . Primero, el ensayo de unión directa se utilizó cuando la trampa de TGF- β se inyectó sobre diversas superficies de isoformas de TGF- β inmovilizado. Mientras que este ensayo puede verificar la unión a diferentes superficies de isoformas de TGF- β , no puede verificar que una interacción 1:1, trampa: homodímero de TGF- β se produce en solución debido a la naturaleza del uso de una superficie de TGF- β inmovilizado. Con el fin de mostrar que la trampa de unión mejora al ligando TGF- β soluble, se llevaron a cabo ensayos de unión indirectos en los que una concentración de TGF-13 constante se preincubó con diversas trampas o concentraciones del monómero de T β RII y después se inyectaron sobre una superficie de anticuerpo 1D11 (anti-TGF- β 1 a 3). De esta manera, la superficie 1D11 mide la cantidad de TGF- β libre (o no unido). Una IC₅₀ inferior indica que la mejora de la unión se debe únicamente a la avidez. En el ensayo de unión directa, la unión de N-His (T β RII)² bivalente a TGF- β 1 y 3 inmovilizado se comparó a la de la construcción N-His T β RII monomérica (**Figura 10A**). N-His (T β RII)² se unió a todas las isoformas de TGF- β (1-3), y mostró una tasa de asociación rápida y significativamente más lenta tasa de disociación de la unión a TGF- β 1 y β 3 en comparación con N-His T β RII monomérico, como se esperaba para una interacción de unión bivalente. Adicionalmente, N-His (T β RII)² mostró unión a TGF- β 2 mientras que la unión de T β RII monomérico a esta isoforma fue indetectable. Además se comparó la unión de N-His (T β RII)² y T β RII-Fc a TGF- β 1 y β 3 (**Figura 10B**). Ambas trampas mostraron cinéticas de unión similares con rápida tasa de asociación y lenta tasa de disociación características. Con el fin de evaluar la unión de la trampa al ligando en solución, se llevó a cabo el ensayo de unión indirecto para determinar IC₅₀s por medio del uso de 5 nM de TGF- β 1. Se generaron las curvas de IC₅₀ para N-His (T β RII)² bivalente, T β RII-Fc y T β RII monovalente (producidos ya sea en células 293 o E. coli) (**Figura 10C**). Tanto N-His (T β RII)² y T β RII-Fc mostraron unión eficaz, con IC₅₀s de 1.1 y 1.6 nM, respectivamente. Las IC₅₀s de N-His T β RII (células 293) y T β RII-ED (E.coli) fueron aproximadamente 8 y 70 veces mayor (respectivamente) que la de N-His (T β RII)². Diferencias similares entre las trampas bivalente y monovalente se observaron en los ensayos de neutralización por medio del uso de las células reporteras de luciferasa Mv1Lu (**Figura 10D**). Las IC₅₀s para N-His (T β RII)² y T β RII-Fc en este ensayo estaban en el intervalo sub nM mientras que N-His T β RII monomérico (células 293) mostró sólo neutralización parcial en el intervalo de 10-100 nM, y T β RII monomérico (E.coli) fue incapaz de neutralizar el TGF- β . Los resultados además mostraron que, en comparación con el prototipo (T β RII)², el N-His (T β RII)² modificado fue más eficaz en la neutralización del TGF- β (compare **las Figuras 9A y 10D**).

Experimento #7: N-His (T β RII)² exhibe estabilidad y actividad a largo plazo

La susceptibilidad de N-His (T β RII)² a la degradación proteolítica se evaluó mediante la incubación de N-His (T β RII)² en presencia de 10% de suero bovino fetal a 37°C por un período de 7 días (**Figura 11**). La transferencia de tipo Western a la izquierda muestra que la proteína N-His (T β RII)² permanece intacta durante todo el período de 7 días. Adicionalmente, las curvas de neutralización a la derecha demuestran que N-His (T β RII)² conserva su actividad. Estos resultados muestran que N-His (T β RII)² no es sensible de manera adversa a la proteólisis y por lo tanto es un buen candidato terapéutico y/o agente de imagen para los estudios en animales.

Experimento #8: El N-His (TβRII)², que tiene un enlazador largo (60 aminoácidos, ver las Figuras 1A y 2A) es más potente que N-His (TβRII)²

5 La IC50 para N-His (TβRIIb)² para la neutralización de TGFβ1 fue 0.04 nM (**Figura 12A**), que es 4 veces más potente que N-His (TβRII)² (IC50 = 0.16 nM, **Figura 10D**). De manera similar, cuando se probaron por análisis de SPR (Biacore) para la unión de TGF-β1 en solución, N-His (TβRIIb)² fue más potente que N-His (TβRII)² (**Figura 12B**). Estos resultados ilustran que la modificación de la longitud del enlazador es al menos un parámetro mediante el cual la eficacia de la trampa se puede mejorar.

10 Experimento #9: (ActRIIb)²: otro ejemplo de una trampa de receptor de una sola cadena dentro de la familia TGF-B

15 Con el fin de mostrar que la estrategia del receptor bivalente de una sola cadena que enseña la presente descripción se puede aplicar a otros ligandos de la familia TGF-β, (ActRIIb)² (que se muestra esquemáticamente en la **Figura 2A**) se construyó a partir del receptor ActRIIb humano por medio del uso de esta estrategia. ActRIIb es el receptor de alta afinidad tanto para miostatina y activina B. (ActRIIb)² y ActRIIb monomérico se produjeron en las células 293 y su capacidad para neutralizar la miostatina se probó por medio del uso de las células A204 de rabdosarcoma humano. Estas células tienen el receptor ActRIIb y se transfectaron con el gen reportero de la luciferasa (CAGA)₁₂ (sensible a la activina y la miostatina) (**Figura 13**). (ActRIIb)² superó la potencia de neutralización de ActRIIb monomérico (IC50 de 0.1 y 0.38 nM, respectivamente), así se demostró la mejor eficacia de unión de esta trampa bivalente. Adicionalmente, (ActRIIb)² fue 10-veces más potente que ActRIIb-Fc dimérico. Estos resultados por lo tanto indican que la estrategia del receptor de una sola cadena que enseña la presente descripción se puede usar como una tecnología de plataforma para desarrollar eficaces reactivos de captura de otros ligandos dentro de la familia TGF-β.

25 Experimento #10: (BMPR1a)²: otro ejemplo de una trampa del receptor de una sola cadena dentro de la familia TGF-B

Otro ejemplo de una trampa del miembro de la familia TGF-β es (BMPR1a)², que se muestra esquemáticamente en la **Figura 2A**. La trampa (BMPR1a)² se comparó con BMPR1a monomérico para la neutralización de BMP2 (**Figura 14**). La trampa (BMPR1a)² bivalente fue claramente capaz de neutralizar BMP2 mientras que BMPR1 monomérico mostró una pobre neutralización.

35 Los agentes de unión de ligando polipéptido multivalentes descritos en la presente descripción permiten una alta afinidad y especificidad por la multivalencia de una sola cadena. Este atributo de una sola cadena es fundamentalmente diferente de los agentes multi-cadenas existentes tales como las fusiones basadas en Fc (dímero covalente), fusiones basadas en E/K-superenrollado (dímero no covalente), o las citocinas y las trampas de ligandos descritas que incluyen restos multimerizantes fusionados. El presente diseño puede facilitar la penetración en el tejido, de ese modo aumenta el acceso a los sitios de interés. El presente diseño además puede proporcionar una media vida más corta en la circulación sistémica, que puede ser deseable para ciertas aplicaciones tales como imágenes y otras aplicaciones de diagnóstico, así como cuando no se desea corriente de distribución sistémica del antagonista abundante. Adicionalmente, el presente diseño permite el enlace de otras moléculas de carga (por ejemplo agentes de imágenes como moléculas fluorescentes), toxinas, etc.

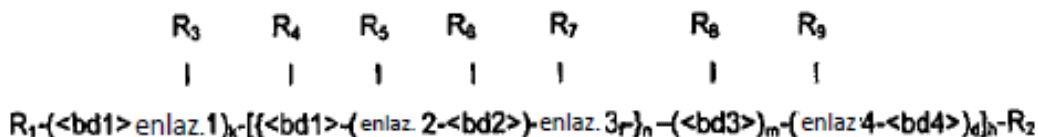
40 Los enlazadores pueden designarse para facilitar la purificación del enlazador y/o agente de unión de ligando. El esquema exacto de purificación elegido determinará qué modificaciones son necesarias, por ejemplo, se contempla la adición de "etiquetas" de purificación tales como las etiquetas His.

La estructura general I

50 $(\text{enlazador1})_k\text{-}[(\text{enlazador2-enlazador3})_n\text{-}(\text{enlazador4})_{dj}]_h$

puede modificarse para añadir una o más moléculas de carga y/o accesorias (denominadas colectivamente en la presente por R₁, R₂, R₃, R₄, etc.).

55 Por ejemplo, para proporcionar la Estructura V:



Donde bd1, bd2, bd3, bd4, enlazador1, enlazador2, enlazador3, enlazador4, k, f, n, m, d, y h se definen como en la Estructura I.

5 Sin limitación la generalidad de sustituyentes R disponibles, R₁, R₂, R₃, R₄, R₅, R₆, R₇, R₈, R₉, pueden ser iguales o diferentes, pueden no estar presentes y cuando están presentes, pueden ser independientemente uno o más de:

10 Una proteína de fusión para dirigir tal como un fragmento de anticuerpo (por ejemplo una sola cadena Fv) y/o un anticuerpo de un solo dominio (sdAb).

15 Un agente de radioterapia y/o imagen tal como un radionucleótido (por ejemplo ¹²³I, ¹¹¹In, ¹⁸F, ⁶⁴C, ⁶⁸Y, ¹²⁴I, ¹³¹I, ⁹⁰Y, ¹⁷⁷Lu, ⁶⁷Cu, ²¹³Bi, ²¹¹At), un colorante fluorescente (por ejemplo Alexa Fluor, colorante Cy) y/o una etiqueta de proteína fluorescente (por ejemplo GFP, DsRed).

20 Un agente citotóxico para la quimioterapia tal como doxorubicina, caliqueamicina, un derivado de maitansinoides (por ejemplo DM1,DM4), una toxina (por ejemplo, endotoxina A de Pseudomonas truncada, toxina de difteria).

25 Un portador basado en nano partículas tales como polietilenglicol (PEG), un polímero conjugado con un fármaco, nanoportador o agente de imágenes (por ejemplo de un polímero N-(2-hidroxiilpropil)metacrilamida (HPMA), ácido glutámico, PEG, dextrano).

Un fármaco (por ejemplo, doxorubicina, camptotecina, paclitaxel, palatinato).

25 Un nanoportador tal como un nanoconcha o liposoma.

Un agente de imagen tal como óxido de hierro supermagnético (SPIO)

30 Un dendrímero

Un soporte sólido para su uso en la purificación del ligando, concentración o secuestro (por ejemplo, nanopartículas, resinas inertes, soportes de sílice adecuados).

35 Generalmente, será preferible no tener moléculas de carga o accesorias en todas las posiciones posibles, ya que esto puede causar complicaciones estéricas o electrostáticas. Sin embargo, los efectos de añadir una molécula de carga o accesorias a cualquier posición o posiciones dadas en la estructura puede determinarse rutinariamente a la luz de lo descrito en la presente descripción mediante la modelación del enlazador entre los dominios de unión y llevar a cabo simulaciones de dinámica molecular para minimizar sustancialmente la energía mecánica molecular y reducir la incompatibilidad estérica y electrostática entre el enlazador y el miembro de la superfamilia TGF-β como se enseña en la presente descripción.

40 Será frecuentemente preferible adicionar la molécula de carga o accesorias a la porción enlazadora del agente, en lugar de al dominio de unión, para reducir la probabilidad de interferencia en la función de unión. Sin embargo, la adición al dominio de unión es posible y podría ser deseable en algunos casos y el efecto de tal adición se puede determinar rutinariamente con antelación mediante la modelación del agente de unión y el enlazador con la adición propuesta como se describe en la presente descripción.

45 En algunas modalidades de conjugación a las moléculas de carga o moléculas accesorias, se produjeron las siguientes estructuras:

50 R-[bd]-(enlazador-[bd])_n

[bd]-(R-enlazador-[bd])_n

R-[bd]-(enlazador-[bd]-R)_n

R-[bd]-(R-enlazador-[bd])_n

[bd]-(R-enlazador-[bd]-R)_n

R-[bd]₄R-enlazador-[bd]-R)_n

10 Las metodologías de conjugación son algo diversas pero típicamente se pueden realizar por medio del uso de kits comerciales que permiten la conjugación a través de grupos reactivos comunes tales como aminas primarias, ésteres de succinimidilo (NHS) y grupos sulfidral-reactivos. Algunos ejemplos son; kit de etiquetado de proteínas con Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, tecnologías de detección Invitrogen) y kits de PEGylación (Pierce Biotechnology Inc.).

15 Muchas modalidades de los agentes de unión que se enseñan en la presente descripción tendrán una masa molecular más baja, en comparación con agentes neutralizantes basados en receptores multivalentes competidores.

20 En una modalidad de la invención se proporcionan agentes de unión de ligandos en donde la secuencia del enlazador de intervención, entre los dominios de unión de ligandos, está compuesta por aminoácidos nativos, cuya secuencia se basa en los ectodominios del receptor (por ejemplo, los diversos enlazadores mostrados en la Figura 2B y los enlazadores "repetición" y "supresión" mostrados en la Figura 2D) o sustituciones conservativas de aminoácidos naturales o no naturales dentro de tales regiones o la reversión de tales secuencias naturales o modificadas. Frecuentemente se considerará preferible usar regiones no estructuradas a partir de los ectodominios de estos receptores como molde para el diseño del enlazador. Una vez diseñados los enlazadores, generalmente será preferible probar su efectividad por medio del uso de procedimientos descritos en la presente descripción u otros procedimientos sustancialmente funcionalmente equivalentes. Las pruebas de rutina para la inmunogenicidad pueden ser deseables para el uso *in vivo*.

30 En algunos casos, será deseable someter el diseño de enlace basado en polipéptido de los agentes de unión de ligandos descrito en la presente descripción a la optimización de las características deseadas para una aplicación particular. Por ejemplo, el enlazador se puede modificar en longitud y composición en base a simulaciones a nivel atómico y un diseño basado en el conocimiento con el objetivo de mejorar la afinidad de unión, la especificidad, la inmunogenicidad y la estabilidad. Esto se aplica a una amplia variedad de sistemas moleculares que exhiben características estructurales ligando-receptor homoméricas, heteroméricas, diméricas y multiméricas.

35 Diferentes dominios de unión adicionales se pueden incorporar para generar trampas multivalentes con una potencia de unión aún mayor.

40 En una modalidad de la invención, un polipéptido hetero-bivalente de una sola cadena no natural se produce por la fusión en línea de dos o más dominios de unión de ligandos con diferentes estructuras (indicados <bd1>, <bd2>, <bd3> y <bd4>) a partir de la porción extracelular de diferentes receptores naturales, y que no se fusiona a ningún resto dimerizante o multimerizante. En algunos casos, este polipéptido tendrá la estructura general <bd1>-enlazador2-<bd2>. En algunos casos, los dominios de unión se seleccionarán de los ectodominios de los receptores TβR-II y TβRI, y se fusionarán para producir trampas de una sola cadena hetero-bivalentes activas contra las isoformas de TGF-β. En otros casos, los dominios de unión se seleccionarán de ectodominios de los receptores ActR-IIa y BMPR-Ia y se fusionarán para generar trampas de una sola cadena hetero-bivalentes activas contra activina, miostatina e isoformas de BMP. En otras modalidades, los dominios de unión se seleccionan a partir de otros receptores de miembros de la superfamilia TGF-β.

50 En una modalidad de la invención, un polipéptido hetero-bivalente de una sola cadena no natural se produce por la fusión en línea de dos o más dominios de unión de ligandos con diferentes estructuras (indicados bd1 y bd2) a partir de la porción extracelular de diferentes receptores naturales, y que no se fusiona a ningún resto dimerizante o multimerizante. En algunos casos, este polipéptido tendrá la estructura general [bd1]-enlazador1-[bd2]-enlazador2-[bd2]. En otros casos, este polipéptido tendrá la estructura general [bd1]-enlazador1-[bd1]-enlazador2-[bd2]. En algunos casos, [bd1] y [bd2] se seleccionarán a partir de los ectodominios de los receptores TβR-II y TβRI, y se fusionarán para producir trampas de una sola cadena hetero-bivalentes activas contra isoformas de TGF-β. En otros casos, bd1 y bd2 se seleccionarán a partir de ectodominios de los receptores ActR-IIa y BMPR-Ia y se fusionarán para generar trampas de una sola cadena hetero-bivalentes activas contra activina, miostatina e isoformas de BMP.

En otra modalidad de la invención un polipéptido hetero-tetraivalente de una sola cadena de origen no natural se produce por la fusión en línea de dos o más dominios de unión al ligando estructurados idénticos o diferentes a partir de la porción extracelular de receptores naturales repetidos dos o más veces en diversos órdenes. En una modalidad de la invención este polipéptido hetero-tetraivalente no está fusionado a ninguna de las porciones de dimerización o multimerización. En una modalidad, este polipéptido tendrá la estructura general [bd1]-enlazador1-[bd2]-enlazador2-[bd1]-enlazador1-[bd2]. En otros casos, este polipéptido tendrá la estructura general [bd1]-enlazador1-[bd1]-enlazador2-[bd2]-enlazador3-[bd2]. En una modalidad, este polipéptido tendrá la estructura general [bd1]-enlazador1-[bd2]-enlazador2-[bd2]-enlazador3-[bd1]. En algunos casos, [bd1] y [bd2] se seleccionarán a partir de los ectodominios de los receptores T β R-II y T β R-I, y se fusionarán para producir trampas hetero-tetraivalentes de una sola cadena activas contra las isoformas de TGF- β . En otros casos, [bd1] y [bd2] se seleccionarán a partir de ectodominios de los receptores ActR-IIa y BMPR-Ia y se fusionarán para generar trampas hetero-tetraivalentes de una sola cadena activas contra activina, miostatina e isoformas de BMP.

Los ejemplos no limitantes específicos de las modalidades de trampas heteroméricas de una sola cadena contra TGF- β se representan esquemáticamente así como con detalles de la secuencia completa en las Figuras 15A y 15B.

Una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína de una sola cadena producida de acuerdo a las enseñanzas de la presente descripción se puede clonar e insertar en cualquier vector adecuado y por lo tanto es muy susceptible para la producción (es decir no se requieren dos vectores, o un vector con dos promotores para expresar dos ectodominios del receptor).

La región enlazadora proporciona un segmento que es diferentes de los dominios de unión de ligandos estructurados y así se puede usar para la conjugación a moléculas (por ejemplo, moléculas útiles para aumentar la estabilidad tales como restos de PEGylación) o moléculas de carga tales como agentes de contraste (para imágenes) sin tener que modificar químicamente los dominios de unión.

En una modalidad de la invención en la que los dominios de unión de ligandos y el enlazador contienen principalmente secuencias naturales no se espera habitualmente que sean severamente inmunogénicos o tóxicos en un paciente típico.

Un tamaño más pequeño (por ejemplo, 50-60 kDa para (T β RII)² comparado con 100-120 kDa para T β RII-Fc o 150 kDa para anticuerpos monoclonales) se esperará generalmente que aumenten el acceso a los tejidos objetivo.

La producción a gran escala es un objetivo alcanzable. Un escalado de 500 ml de N-His (T β RII)² en células 293 produjo 7 mg de proteína pura.

En algunos casos, se puede desear permitir que una computadora u otra máquina capaz del cálculo para determinar la longitud del enlazador de acuerdo a la descripción en la presente descripción. Así, en una modalidad de la invención se proporciona un medio de almacenamiento de datos que comprende instrucciones para determinar la mínima longitud del enlazador. En una modalidad de la invención se proporciona un medio de almacenamiento de datos que comprende medios para identificar la mínima longitud del enlazador aceptable.

La longitud del enlazador se considerará aceptable cuando permita que la unión de los dominios de unión localizados en cada extremo N- y C- del enlazador se unan a sus sitios de unión naturales en sus ligandos naturales, de forma tal que, con ambos dominios de unión unidos de esa forma, el ligando se une con una mayor afinidad que con la que se uniría mediante la unión a uno solo de los dominios de unión.

Métodos

Construcción y clonación de trampas de la familia TGF β

1) Prototipo (T β RII)²

Etapa 1: El vector de expresión de mamíferos pTT2-RIIE (De Crescenzo y otros, 2003, J. Mol. Biol. 328: 1173), que contiene un ectodominio etiquetado con myc del receptor TGF- β humano tipo II (T β RII) se cortó con NotI y BamHI para eliminar las regiones His/E-coli. *Etapa 2:* Un segundo ectodominio de T β RII se amplificó por PCR a partir del plásmido huTGF β RII/pCDNA3 como molde y por medio del uso de cebadores R2ECD3'Bamrev2 y R2ECD 5' Not para incorporar un sitio 3' Bam HI etiquetado con 6-His, y un sitio de restricción 5' Not I, respectivamente.

R2ECD3'Bamrev2: sec. con núm. de ident. 1

GACAGGATCCTAGTGATGATGGTGGTGGTGCAGGATTGCTGGTGTATATTC
R2ECD 5'Not: sec. con núm. de ident. 2
 CACGGCGGCCGCCACGTTTCAGAAGTCGGTTAATAAC

5 Este producto de PCR se ligó a pCDNA3 cortado con NotI y BamHI. El inserto se verificó mediante secuenciación, se volvió a cortar mediante digestión con Not I/Bam HI y después se clonó en el vector de la etapa 1, lo que resultó en el ensamblaje de dos ectodominios TβRII en tándem. La secuencia de esta construcción se verificó mediante secuenciación y la secuencia de aminoácidos de la proteína prototipo (TβRII)² se muestra más abajo y se presenta esquemáticamente en **la Figura 6**.

10 **Prototipo (TβRII)²: sec. con núm. de ident. 3**

[MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAST]IPP[EQKLISEEDLL]HVQKSVNNDMIVTDNNGAVKF
 PQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCAVWRKNDENITLETVCHDPK
 15 LPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECNDNIIFSEEYNTSNPDGGRHV
 QKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCA
 VWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSSSDECND
 NIIFSEEYNTSNPD[HHHHHH]

20

* La secuencia gris dentro de paréntesis indica el péptido señal huTβRII que se cliva al procesarse en células 293. Las secuencias en recuadros (EQK...LL y HH...HH), son etiquetas Myc y His, respectivamente.

2) Monómero N-His (TβRII)² y N-His TβRII modificado

25

Etapa 1: Reversión de los aminoácidos no nativos GGR a los aminoácidos nativos IPP en los enlazadores del prototipo (TβRII)²

30

El sitio Not1 dentro de la secuencia codificante del enlazador del prototipo (TβRII)² creó una secuencia GGR (subrayada en las secuencias de aminoácidos mostradas anteriormente). Esto se revirtió a la secuencia IPP nativa por mutagénesis basada en PCR. Los cebadores internos 2XR2mutfor y 2Xmutrev abarcan la región a mutar y dos cebadores flanqueadores pTT2 5' y pTT2 3' contienen las regiones flanco.

2XR2mutfor : sec. con núm. de ident. 4
 CCTGACATCCCACCGCAGGTTTCAGAAG
2Xmutrev: sec. con núm. de ident. 5
 GAACGTGCGGTGGGATGTCAGGATTGC
pTT2 5' sec. con núm. de ident. 6
 ATACACTTGAGTGACAATGACA
 40 **pTT2 3' sec. con núm. de ident. 7**
 AAAATTCCAACACACTACTTTGCAATCT

45

El molde usado fue pTT2-prototipo(TβRII)². Los cebadores pTT2 5' y 2XR2mutrev se aparearon para crear el fragmento 1 de PCR. Los cebadores pTT2mutfor y PTT2 3' se aparearon para crear el fragmento 2 de PCR. Los fragmentos de PCR 1 y 2 se calentaron a 95 °C y se hibridaron juntos. Los cebadores flanqueadores se usaron después para amplificar los fragmentos ensamblados 1+2. Los fragmentos amplificados 1+2 después se cortaron con HindIII y BamHI y se insertaron en el vector pTT cortado además con HindIII y BamHI. El plásmido resultante se designó pTT2-nativo(TβRII)².

50

Etapa 2: Eliminación de las etiquetas His C-terminal y Myc N-terminal y fusión con etiqueta His N-terminal/ sitio de clivaje trombina.

Se diseñaron dos cebadores, que incorporan el cambio de secuencia deseado (sitio de restricción, sitio de clivaje trombina, y eliminación de la etiqueta mycMyc, y la etiqueta His).

BamHI-Thr-IPP-R2ECD_for: sec. con núm. de ident. 8

GGATCCTTCAACCCGCGTATTCCGCGCACGTTTCAGAAGTCGGTT

BstBI stop R2ECD rev : sec. con núm. de ident. 9

GCGTTCGAACTAGTCAGGATTGCTGGTGTATATTC

5

Estos cebadores se usaron para generar dos fragmentos por PCR por medio del uso de pTT2-nativo(TβRII)² como un molde: fragmento 1XECD (monómero) y 2XECD (dímero). Ambos fragmentos se digirieron con BstBI y BamHI y se clonaron de separadamente en el vector plasmídico pTTVH8G (no publicado, derivado a partir del vector pTT; Durocher y otros, 2002, Nucl. Acid. Res. 30: Núm.. 2 e9) que tiene la secuencia señal del VEGF humano/10 aminoácidos N-terminales del VEGF y la etiqueta 8Xhis. Las secuencias de proteína de las construcciones resultantes son como sigue:

10

N-His (TβRII)₂: sec. con núm. de ident. 10

[M N F L L S W V H W S L A L L L Y L H H A K W S Q A] A P M A E G G G Q N [H H H H]
 [H H H H] G G S F N P R I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F
 C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E
 N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M
 C S C S S D E C N D N I I F S E E Y N T S N P D [I P P] H V Q K S V N N D M I V T D
 N N G A V K F P Q L C K F C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q
 E V C V A V W R K N D E N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M
 K E K K K P G E T F F M C S C S S D E C N D N I I F S E E Y N T S N P D

15

20

25

* La secuencia gris entre paréntesis indica el péptido señal VEGF. Las secuencias en recuadro; (HH...HH y IPP), son la etiqueta His y la secuencia IPP reversa, respectivamente.

monómero N-His TβRII : sec. con núm. de ident. 11

30

[M N F L L S W V H W S L A L L L Y L H H A K W S Q A] A P M A E G G G Q N [H H H H]
 [H H H H] G G S F N P R I P P H V Q K S V N N D M I V T D N N G A V K F P Q L C K F
 C D V R F S T C D N Q K S C M S N C S I T S I C E K P Q E V C V A V W R K N D E
 N I T L E T V C H D P K L P Y H D F I L E D A A S P K C I M K E K K K P G E T F F M
 C S C S S D E C N D N I I F S E E Y N T S N P D

35

3) N-His (TβRIIb)²

40

Etapa 1: Ensamblaje del gen (TβRIIb)².

a. El plásmido pTT2-nativo(TβRII)² se cortó con NotI y BamHI para eliminar el segundo TβRIIECD.

b. Se generó un fragmento de PCR por medio del uso del plásmido pRC/CMV-huTβRIIb (que contenía el gen humano TβRIIb) como un molde con los siguientes cebadores:

45

R2ECD-3'Bamrev-2: sec. con núm. de ident. 12

GACAGGATCCTAGTGATGATGGTGGTGGTTCAGGATTGCTGGTGTATATTC

y

R2bECD 5'Not for: sec. con núm. de ident. 13

CACGGCGGCCGCCACGTTTCAGAAGTCGGATGTGG

50

El fragmento resultante comprende el TβRIIb con una etiqueta 3' 6-His, un sitio Bam HI y codón de terminación, y Not I en el extremo 5'. Este fragmento se cortó con Not I y Bam HI y después se clonó en el vector de la etapa a.

55

Etapa 2:

Por medio del uso del plásmido de la etapa 1b como molde se generó un fragmento de PCR (que elimina la etiqueta Myc N-terminal y la etiqueta His C-terminal) con los siguientes cebadores:

5 **BamHI-Thr-IPP-R2-ECD-for: sec. con núm. de ident. 14**
GGATCCTTCAACCCGCGTATTCCGCCGCACGTTCAAGTCGGTT
BstBI terminación R2ECD rev: sec. con núm. de ident. 15
CGTTTCAACTAGTCAGGATTGCTGGTGTTATATTC

10 El fragmento de PCR resultante se digirió con las enzimas adecuadas y se subclonó en pTTVH8G. La secuencia de proteína de esta trampa es como sigue:

N-His (TβRIIb)2: sec. con núm. de ident. 16

15 [MNFLLSWVHWSLALLLYLHHAKWSQA]APMAEGGGQN[HHHHHHHH]GGSF
NPRIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICE
KP
QEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCS
S
20 DECNDNIIFSEEYNTSNPDIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHINNDMIVT
DNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQEVCVAVWRKNDENITL
ET
VCHDPKLPYHDFILEDAASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSDECNDNIIFSEEYNTSNP
D

25

* La secuencia gris entre paréntesis indica el péptido señal VEGF. La secuencia en recuadro es la etiqueta His.

30 4) (ActRIIB)² y monómero ActRIIB

Para la construcción de (ActRIIB)², se usaron tres pares de cebadores (1+2, 3+4, 5+6) para generar 3 fragmentos de PCR (A, B y C) por medio del uso de un plásmido que contiene la secuencia humana ActRIIB como un molde.

35 **Cebador1: sec. con núm. de ident. 17**

cgcagatctgcccgcATGACGGCGCCCTGGGTGGCCCTCGCCCTCCTCTGGGGATCG
CTGTGCGCAGGATCAGGATCAGAACAGAAGCTGATCaGCG

Cebador2: sec. con núm. de ident. 18

CCGtGATCAGCTTCTGTTCTGATCCTGATCCTGCGCACAGCGATCCCCAGAGGAGG
GCGAGGGCCACCCAGGGCGCCGTCATgcccgcagatctggc

40

Cebador3: sec. con núm. de ident. 19

GGCaGATCTCCGAGGAAGATTTACTAGGGCGTGGGGAGGCTGAGACACGGGAGT
G CATC

45

Cebador4: sec. con núm. de ident. 20
ccgactagtGGGGGCTGTCGGGGGTGGCTC

50 **Cebador5: sec. con núm. de ident. 21**
ccgactagtGGGCGTGGGGAGGCTGAGAC

Cebador6: sec. con núm. de ident. 22

cgctggatccCTAATGGTGATGATGGTGATGGGTGGGGGCTGTCGGGGGTGGC

5 El fragmento de PCR A contiene sitios 5' Bgl II y NotI, el codón de iniciación ATG, el péptido señal y la mitad 5' de la etiqueta Myc y el sitio Bcl I. El fragmento de PCR B contiene el primer ECD, con un sitio BgIII y la mitad 3' de la etiqueta Myc y el sitio Spel. El fragmento C contiene el segundo ECD, el sitio Spel en el extremo 5', y un sitio BamHI, codón de terminación, la etiqueta 6Xhis en el extremo 3'. Estos fragmentos se subclonaron en el vector pGemT (Promega), se digirieron con las enzimas apropiadas, y se ligaron juntos. El fragmento resultante A+B+C, que codifica el dímero de una sola cadena (ActRIIB)², se cortó por medio del uso de NotI y BamHI y se insertó en el vector de expresión pTT. El monómero ActRIIB se ensambló de forma similar por medio del uso de los pares de cebadores 1+2 y 3+6. Las construcciones resultantes tienen las siguientes secuencias de proteínas:

(ActRIIB)²: sec. con núm. de ident. 23

15 [MTAPWVALALLWGSLCAG]SGS[EQKLISEEDLL]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQ
SG
LERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYF
CCCE
GNFCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPTSSGRGEAETRECIYYNANWELERTNQSGL
20 ERC
EGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCCCE
GNFC
NERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT[HHHHHH]

25

monómero ActRIIB: sec. con núm. de ident. 24

30 [MTAPWVALALLWGSLCAG]SGS[EQKLISEEDLL]GRGEAETRECIYYNANWELERTNQ
SGLE
RCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELVKKGCWLDDFNCYDRQECVATEENPQVYFCC
CEGN
FCNERFTHLPEAGGPEVTYEPPTAPT[HHHHHH]

35

*La secuencia gris entre paréntesis indica el péptido señal ActRIIB humano. Las secuencias en recuadros (EQK...LL y HH...HH), son etiquetas Myc y His, respectivamente.

40 **5) (BMPR1a)² y monómero BMPR1a**

Para la construcción (BMPR1a)², se usaron 2 pares de cebadores (1+2, 5+6) para generar dos fragmentos de PCR (A, B) por medio del uso de un plásmido que contiene la secuencia humana BMPR1a (ALK3) como un molde.

45 **Cebador1for:** sec. con núm. de ident. 25 GCG AAG CTT ATG CCT CAG CTA TAC ATT TAC ATC

Cebador4rev: sec. con núm. de ident. 26 CGGC CTC CGG ATG CTG CCA TCA AAA AAC GG

Cebador5for: Sec. Con. Núm. de ident. 27 CCGCG CGC CGG CAG AAT CTG GAT AGT ATG CTT

C

**Cebador5rev : Sec. Con. Núm. de ident. 28 CGAC AGG ATC CTA GTG ATG ATG GTG GTG ATG
TCG AAT GCT GCC ATC AAA AAA CGG**

El fragmento de PCR A contiene un sitio 5'Hind III, codón de iniciación, péptido señal y el primer BMPR1aECD. El fragmento de PCR B contiene el segundo BMPR1aECD, etiqueta 6Xhis, codón de terminación y sitio BamHI.

Estos fragmentos se subclonaron en el vector pGemT (Promega), se digirieron con las enzimas apropiadas, y se ligaron juntos. El fragmento A+B resultante, que codifica el dímero de una sola cadena (BMPR1a)², se cortó con HindIII y BamHI y se insertó en el vector de expresión pTT2. El monómero BMPR1a se ensambló por medio del uso de los pares de cebadores 1+6. Las construcciones resultantes tienen las siguientes secuencias de proteínas:

(BMPR1a)²: sec. con núm. de ident. 29

[MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVQG]QNLDSMLHGTGMKSDSDQKKSENGVT
LAPEDTLPFLKCYSGHCPDDAINNTCITNGHCFIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDF
Q
CKDSPKAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVIGPFFDGSIRQNLDSMLHGTGMKSD
SD
QKKSENGVTLAPEDTLPFLKCYSGHCPDDAINNTCITNGHCFIIEEDDQGETTLASG
C
MKYEGSDFQCKDSPKAQLRRTIECCRTNLCNQYLQPTLPPVIGPFFDGSIR[HHHHHH]

monómero BMPRa : sec. con núm. de ident. 30

[MPQLYIYIRLLGAYLFIISRVQG]QNLDSMLHGTGMKSDSDQKKSENGVTLAPEDTLPFL
K
CYSGHCPDDAINNTCITNGHCFIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSDFQCKDSPKAQL
RR
TIECCRTNLCNQYLQPTLPPVIGPFFDGSIR[HHHHHH]

* La secuencia gris entre paréntesis indica el péptido señal BMPR1a humano. La secuencia en recuadro es la etiqueta His.

Expresión y purificación de los agentes de unión de ligandos

Células de riñón embrionarias humanas modificadas (293-EBNA1 clon 6E) que expresan establemente EBNA1 se transfectaron por medio del uso de polietilenimina lineal de 25 kDa (PEI) (Poysciences, Warrington, PA) como se describió más abajo (y Durocher y otros, 2002, Nucl. Acid Res. 30: e9)). Las células que crecen como cultivos en suspensión en medio Freestyle (Invitrogen) se transfectaron a 1×10^6 células/ml con cantidades variables de ADN de vector plasmídico pTT (para cultivos a pequeña escala), o una cantidad fija de ADN plasmídico (para cultivos a gran escala), y 2 ug/ml PEI.

1. Transfecciones transitorias a pequeña escala:

Quinientos microlitros del cultivo en suspensión se distribuyeron por pozo en una placa de 12 pozos. El ADN se diluyó en medio Freestyle (en un volumen equivalente a un décimo del cultivo a transfectar), se añadió PEI, y la mezcla se agitó con vórtice y se incubó por 10 min a temperatura ambiente antes de su adición a las células. Después de 3 h de incubación con complejos ADN-PEI, el medio de cultivo se completó a 1 ml. El cultivo se cosechó 5 días después de la transfección y el medio se aclaró por centrifugación a 3500 g por 10 min y se filtró estéril. Las alícuotas de medio condicionado se analizaron por actividad de unión a TGF- β a través del análisis SPR (ver más abajo y **Figura 7A**)

2. Cultivos a gran escala y purificación de proteínas:

Los cultivos a gran escala se procesaron según (Pham y otros, 2005: *Biotechnol. Bioeng.* 90: 332). Biorreactores de 1L (Biostat Q, B. Braun, Alemania) se equiparon con impelentes de cuchillas inclinadas 45° y la velocidad de agitación se mantuvo a 100 rpm. La aireación de la superficie se aplicó con una mezcla de gas de nitrógeno, dióxido de carbono y oxígeno a una régimen de flujo de gas de 100 cm³ cúbicos estándar/min). La tensión de oxígeno disuelto se controló a 40% de saturación de aire. La temperatura se mantuvo a 37 °C y el pH se mantuvo a 7.15 con CO₂ al inicio de la corrida y con NaHCO₃ (7.5% p/v) durante la fase de crecimiento celular. Una alimentación con 0.5% (p/v) TN1 peptona (OrganoTechnie) se realizó 24 horas después de la transfección. El medio de cultivo se cosechó 120 horas después de la transfección y la proteína trampa se purificó por cromatografía de afinidad de metales inmovilizados en columna Fractogel-Cobalto como se describió previamente (Cass y otros, 2005, *Protein Expr. Purif.* 40: 77) excepto que las etapas de lavado y elución contenían 25 mM y 300 mM de imidazol respectivamente. Una columna de 10 ml se empacó con 5 cm de resina de afinidad de metales Talon (BD Biosciences, Mississauga, Ont.) y se equilibró con 10 volúmenes de lecho de columna (CVs) de amortiguador de lavado Talon (TWB: 50 mM fosfato sódico, 300 mM NaCl, pH 7). El medio condicionado se pasó a través de un filtro de 0.22 µm, y después se cargó por gravedad. La columna se lavó con 10 CVs de TWB y el (TβRII)² se eluyó en fracciones de 1 ml por medio del uso de 300 mM imidazol en TWB. La proteína trampa eluida se desaló en PBS por medio del uso de una columna de desalar HiPrep 26/10 (GE-Healthcare) según lo recomendado por el fabricante. La concentración de proteína se determinó por Bradford por medio del uso de BSA como un estándar. El progreso de las diversas etapas de purificación para N-His (TβRII)² se ve en la **Figura 8**

Experimentos de resonancia de plasmón superficial (SPR)

Análisis del medio condicionado de las células transfectadas 293-EBNA1 clon 6E para actividad de unión al TGFβ

El medio condicionado de las células, transfectadas con cantidades crecientes del plásmido pTT2-prototipo (TβRII)² (para generar porcentajes crecientes de células transfectadas en el intervalo desde 1-95%), se recogieron 5 días después de la transfección y se filtraron estériles (0.22 µm). Las muestras se diluyeron a 1:100 o 1:20 por medio del uso de amortiguador HBS (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, y 0.02% Tween 20) antes del análisis de la resonancia de plasmón superficial (SPR) de la interacción de (TβRII)² con TGF-β3. Los datos de SPR se generaron por medio del uso de un instrumento Biacore 3000 (G.E. Healthcare Inc.) a 25 °C por medio del uso HBS como amortiguador de corrida. Se preparó el ligando mediante la inmovilización covalente de 2000 unidades de resonancia (RUs) de TGF-β3. junto con una superficie control blanco simulada, en un chip sensor de Biacore CM-5 por medio del uso de métodos estándar de acoplamiento de aminas. Las muestras se inyectaron simultáneamente sobre las superficies con TGF-β3-inmovilizado y blanco por 240 s seguido por un tiempo de disociación de 240 s a una régimen de flujo de 10 µl/min. Los sensogramas de interacción específica (TβRII)²-TGF-β3 se generaron mediante la sustracción del sensograma generado por la superficie blanco de la generada por la superficie con TGF-β3-inmovilizado. Los sensogramas se alinearon a los puntos de inicio de la inyección por medio del uso del software BiaEval versión 4.1 (Biacore Inc.), como se muestra en **la Figura 7A**.

Asociación y disociación de TβRII, prototipo (TβRII)² y TβRII-Fc con TGFβ

Se generaron sensogramas que comparan (TβRII)² con TβRII-Fc y el ectodominio monomérico TβRII producido en E.coli. La superficie del ligando y las condiciones de inyección fueron las mismas que se describieron anteriormente excepto que los tiempos de inyección fueron por 120 s. Se usaron para el análisis soluciones que contenían 200 nM de TβRII purificado y 25 nM de TβRII-Fc en amortiguador HBS. El medio condicionado de (TβRII)² (a partir de 95% de células transfectadas) se diluyó 1:20 en amortiguador HBS. Los sensogramas SPR generados a partir de estas inyecciones de muestra se alinearon a sus puntos de inicio de inyección y se normalizaron a una respuesta RU máxima de 100 por medio del uso del software de Biacore BiaEval versión 4.1 (Biacore Inc.), como se muestra en **la Figura 7B**.

Comparación de las eficacias de unión a TGFβ de (TβRII)², TβRII-Fc y monómero de TβRII purificados

Soluciones que contenían una variante de TβRII ((TβRII)², TβRII-Fc o TβRII producido en E.coli) y 5 nM de TGF-β (β1 o β3) se pre-incubaron y después se inyectaron sobre el anticuerpo 1D11 anti-TGF-β covalentemente inmovilizado (R&D Systems) bajo condiciones limitantes de transporte de masa para medir el TGF-β libre. Los datos de SPR se generaron por medio del uso de un instrumento Biacore 3000 (G.E. Healthcare Inc.) por medio del uso de HBS como amortiguador de corrida. Una superficie de 1D11 altamente densa (aproximadamente 10,000 RUs) y la superficie de control blanco coincidente se crearon en un chip sensor Biacore CM-5 por medio del uso de métodos estándar de acoplamiento de aminas. Se usó una solución madre veinte veces concentrada de TGF-β (100 nM en 10 mM de ácido acético). Esto dio la concentración final del ensayo de una vez de TGF-β (5 nM) cuando se añadieron 10 µl a 190 µl de HBS que contenía una

variante de T β RII a 1.05 veces la concentración final. Se hicieron muestras de inyección blanco a partir de 10 μ l de 10 mM ácido acético mezclado con 190 μ l de HBS. El TGF- β se añadió a la solución de variante de T β RII por medio del uso del comando TRANSFER, se mezcló, e incubó por 120 s a 4 $^{\circ}$ C antes de la inyección sobre la superficie de 1D11. Por medio del uso del comando KINJECT, las muestras se inyectaron simultáneamente por 5 min sobre las superficies de 1D11 y control con un tiempo de disociación de 30 s a una régimen de flujo de 5 μ l/min a 25 $^{\circ}$ C. La superficie de 1D11 se regeneró para el próximo ciclo mediante la inyección de 10 mM de HCl por 15 s a 20 μ l/min por medio del uso del comando INJECT. Todos los análisis de sensograma se llevaron a cabo por medio del uso del software Biacore BiaEvaluation v4.1 (G.E. Healthcare Inc.). Los sensogramas de la variante T β RII se alinearon a los puntos de inicio de la inyección, y se referenciaron doble por medio del uso de los sensogramas de inyección de la superficie control y el blanco. Los niveles de meseta (que miden la cantidad de TGF β libre) se tomaron a partir del valor promedio de la fase de disociación estable de cada sensograma referenciado doble. Los ejemplos se muestran en las **Figuras 9B, 10C y 12B**.

Comparación de las potencias antagonista/inhibidora de diversos agentes de unión por el ensayo reportero de la luciferasa.

1. Ensayo de la luciferasa para un agente de unión al TGF- β en células epiteliales de pulmón de visón (Mv1Lu).

Se usaron células epiteliales de pulmón de visón, establemente transfectadas con el promotor *PAl-1* respondedor a TGF- β fusionado al gen reportero de la luciferasa de luciérnaga (Abe y otros, 1994, Anal. Biochem. 216: 276). Estas células se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pozos (2×10^4 células/pozo) en medio Eagle modificado de Dulbecco que contenía 5% de suero fetal bovino y se dejaron adherir por al menos 6 h a 37 $^{\circ}$ C. Las células después se lavaron con solución salina amortiguada con fosfato (PBS), y el medio se reemplazó por TGF- β 1.0% de suero fetal bovino y 0.1% de albúmina de suero bovino (DMEM-1, 0.1% BSA). Diversas concentraciones de (T β RII)² o trampa (T β RIIb)² o T β RII-Fc (de R&D Systems o el colaborador Dr. Herbert Lin) purificados se mezclaron con 20 pM de TGF- β 1 en DMEM-1, 0.1% BSA) y se añadieron a las células. Después de 16 h de incubación a 37 $^{\circ}$ C, se retiró el medio, y las células se lavaron una vez con PBS. Las células después se lisaron con 25 μ l de amortiguador de lisis reportero (Promega Corp.) y se ensayaron por actividad luciferasa por medio del uso del kit del ensayo de la luciferasa de Promega de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La luminiscencia se midió en un lector de microplacas MRX (Dynex Inc.) o Lumioskan RS (Global Medical Instrumentation, Inc.). La actividad se expresa como el porcentaje de la actividad TGF- β 1 máxima (es decir en ausencia de cualquier antagonista) o unidades de luciferasa relativas (RLU) (ver ejemplos mostrados en las **Figuras 9A, 10D y 12A**).

2. Ensayo de luciferasa para los agentes de unión ActRIIB en células A204.

Las células A204 (rabdomiosarcoma, ATCC) se sembraron en placas de cultivo de 48 pozos (5×10^4 células/pozo) en medio McCoy's 5A (ATCC) suplementado con 10% de suero fetal bovino. Después de 24 h las células se transfectaron con (CAGA)₁₂MLP-Luc (reportero de luciferasa respondedor a activina y miostatina; Dennler y otros, 1998, EMBO J. 17: 3091) y pRL-CMV (reportero constitutivo de renilla para la normalización de las transfecciones, Promega Corp.) por medio del uso del agente de transfección Lipofectamina 2000, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Gibco-BRL). Después de 24 horas las células se lavaron una vez con DMEM-1, 0.1% de BSA y después se trataron con 4 nM de miostatina humana (GDF8, R&D Systems) sin o con concentraciones crecientes de trampa ActRIIb o ActRIIb-Fc (R&D Systems) por 6 h, 37 $^{\circ}$ C. Las células se lavaron después una vez con PBS y se lisaron con 50 μ l de amortiguador de lisis pasiva 1X. Los lisados se midieron mediante un kit reportero de luciferasa dual luciérnaga/renilla, de acuerdo a los fabricantes (Promega Corp). La actividad se expresa como RLU de luciérnaga normalizada a renilla (ver ejemplo mostrado en la Figura 13).

3. Ensayo de luciferasa para los agentes de unión a BMPR1a en células C2C12BRA.

Las células C2C12BRA (células de mioblastoma de ratón establemente transfectadas con un reportero de luciferasa BMP; Zilderberg y otros., 2007, BMC Cell Biology 8: 41) se sembraron en placas de cultivo de 96-pozos (5×10^3 células/pozo) en DMEM suplementado con 10% suero fetal bovino. Después de 24 h las células se lavaron una vez con DMEM-1, 0.1% BSA y después se trataron con 1 nM de BMP2 humano con o sin cantidades crecientes de trampa BMPR1a o BMPR1a-Fc. (R&D Systems) por 24 h a 37 $^{\circ}$ C. Las células después se lavaron una vez con PBS y se lisaron con 50 μ l de amortiguador de lisis reportero 1X. Los lisados se midieron mediante un kit reportero de luciferasa de luciérnaga, de acuerdo a los fabricantes (Promega Corp). La actividad se expresa como RLU de luciérnaga (ver ejemplo **Figura 14**).

Neutralización/inhibición de la invasión de células 4T1 inducida por el TGF- β por agentes de unión a TGF β

Las células 4T1 (carcinoma mamario de ratón, ATCC) se sembraron en cámaras de invasión BD BioCoat Matrigel (BD Biosciences) a 1×10^5 células/cámara en DMEM que no contenía suero, sin o con 100 pM TGF- β , y con 400 nM de la trampa prototipo (T β RII)² o T β RII-Fc. Se dejó a las células invadir a través del matrigel dentro de la cámara del fondo por 18 hrs a

37 °C. Las células en el lado superior de la membrana de matrigel se eliminaron mediante el raspado y las células que invadieron se tiñeron/fijaron con 0.2% de cristal violeta, 100% etanol. El número de las células que invadieron se cuantificó para 4 campos de igual tamaño a través del microscopio. El ejemplo que se muestra en la **Figura 9C** muestra el promedio % de invasión (en relación al control + de TGF-β) a partir de 3 experimentos.

Transferencia de tipo Western para determinar la estabilidad de la proteína N-His (TβRII)² en suero.

Cantidades iguales de la proteína N-His (TβRII)² se incubaron por 1-7 días a 37 °C en DMEM+10% suero fetal bovino. Alícuotas iguales se sometieron a electroforesis en un gel reductor 8% SDS seguido por transferencia de tipo western y el sondeo con un anticuerpo anti-TβRII (R&D Systems). El resultado se muestra en la **Fig. 11A**.

Tabla 1. Características de los enlazadores para ejemplos seleccionados de trampas de una sola cadena de los factores de crecimiento de la familia TGF-β. El mínimo número de residuos requeridos para el enlace representa la distancia lineal basada en la estructura para el enlace (A) dividida por un factor 2.5.

Trampa de una sola cadena	Ligando(s) objetivo(s)	Ectodominio del receptor usado	Estructuras de referencia (entradas PDB)	Residuos en enlazadores "naturales"	Distancia lineal (Å) para el enlace	Mínimo de residuos requeridos para el enlace
(ActR-Ia) ²	BMP-7	ActR-Ia-ED	2GOO, 1LX5	28	70	28
(ActR-IIb) ²	Activina Miostatina	ActR-IIb-ED	1S4Y, 1NYU	25	45, 50	18
(BMPR-Ia) ²	BMP-2	BMPR-Ia-ED	2GOO, 1ES7	41	60	24
(TβR-II) ²	TGF-β1 TGF-β3	TβR-II-ED	1KTZ, 1PLO, 1M9Z	35	80	32
(TβR-IIb) ²	TGF-β1 TGF-β3	TβR-IIb-ED	1KTZ, 1PLO, 1M9Z	60	80	32

Tabla II:

Además de los enlazadores descritos en otra parte en la presente descripción, las siguientes secuencias de polipéptidos pueden ser útiles como enlazadores o componentes de estos. Estos polipéptidos pueden ser útiles cuando se producen por medio del uso de L-o D-aminoácidos. Sin embargo, con respecto a las sec. con núms. de ident. 82 a 118, el uso de D-aminoácidos será frecuentemente preferido.

COOH -IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP- NH2 sec. con núm. de ident. 119

COOH -SEEYNTSNPD NH2

sec. con núm. de ident. 83

COOH IPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHLRHHNNDMIVTDNNGAVKFP-NH2 sec. con núm. de ident. 84

ES 2 449 753 T3

COOH -SEEYNTSNPD NH2	sec. con núm. de ident. 85
COOH -AALLPGAT NH2	sec. con núm. de ident. 86
COOH -PTTVKSSPGLGPVE NH2	sec. con núm. de ident. 87
COOH -AILGRSE NH2	sec. con núm. de ident. 88
COOH -EMEVQPTSNPVTPKPPYYNI NH2	sec. con núm. de ident. 89
COOH -SGRGEAET NH2	sec. con núm. de ident. 90
COOH -EAGGPEVTYEPPTAPT NH2	sec. con núm. de ident. 91
COOH -QNLDMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPED NH2	sec. con núm. de ident. 92
COOH -PVVIGPFFDGSIR NH2	sec. con núm. de ident. 120
COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 93
<p>COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINNDMIVT DNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 94</p>	
COOH -EAGGPEVTYEPPTAPTSGRGEAET NH2	sec. con núm. de ident. 95
COOH -PVVIGPFFDGSIRQNLDMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPED NH2	sec. con núm. de ident. 96
COOH -PVVIGPFFDGSIRGNLDMLHGTGMKSDSDQKSENGVTLAPED NH2	sec. con núm. de ident. 97
COOH -SEEYNTSNPDGPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 98
COOH -EAGGPEVTGEPPTAPTSGRGEAET NH2	sec. con núm. de ident. 99
<p>COOH -SEEYNTSNPDGGRHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINND MIVTDNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 100</p>	
COOH -SEEYNTSNPDGGPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 101
COOH-SEEYNTSNPDGG-RHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 102 NH2
<p>COOH-SEEYNTSNPSGGGSGGGSGGGMEAQKDEIICPSCNRTAHPLRHINND MIVTDNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 103</p>	
COOH -SEEYNTSNPSGGGSGGKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 104
COOH -SEEYNTSNPSGGGSGGGSGGDMIVTDNNGAVKFP NH2	sec. con núm. de ident. 105
<p>-SEEYNTSNPDIPPHVQKSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGNNDMI VTDNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 106</p>	

COOH -SEEYNTSNPDGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGNND MIVTDNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 107	
COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2 sec. con núm. de ident. 108	
COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSVNNDMIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2 sec. con núm. de ident. 109	
COOH -SEEYNTSNPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2 sec. con núm. de ident. 110	
COOH -SEEYNTSNPDGGGGGGGGIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2 sec. con núm. de ident. 111	
COOH -SEEYNTSNPDGGGGSGGGSGGGSSIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP NH2 sec. con núm. de ident. 112	
COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRRTAHPLRHINNDM IVTDNNGAVKFP NH2 Sec. con núm. de ident. 113	
COOH -SEEYNTSNPDIPPHVQKSDVEMEAQKDERTAHPLRHINNDMIVTDNNGAVK FP NH2 Sec. con núm. de ident. 114	
COOH -EAGGPEVTYEPPTAPTSGRGEAET NH2 sec. con núm. de ident. 115	
COOH -EAGGPEVTYEPPTAPTGGGGGGGGGGSGRGEAET NH2 sec. con núm. de ident. 116	
COOH -PVVIGPFFDGSIRQNLD SMLHGTGMKSDSDQKKSENGVTLAPED NH2 sec. con núm. de ident. 117	
COOH -PVVIGPDGSIRQNLD SHGTGMKSDSDQKKSENGVTLAPED NH2 sec. con núm. de ident. 118	

Se contemplan además las secuencias de ácido nucleico que codifican tales enlazadores.

LISTA DE SECUENCIAS

5

<110> National Research Council of Canada

<120> ANTAGONISTAS DE LIGANDOS Y USOS DE ESTOS

10

<130> NRC022EP

<160> 120

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 54

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

20

<220>
 <223> Cebador sintético

 <400> 1
 5 **gacaggatcc tagtgatgat ggtggtgatg gtcaggattg ctggtggtat attc**
 54

 <210> 2
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador sintético
 15 <400> 2

 cacggcggcc gccacgttca gaagtcggtt aataac
 36

 <210> 3
 <211> 312
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 25 <400> 3

 Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu
 1 5 10 15

 Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr Ile Pro Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser
 20 25 30
 30

ES 2 449 753 T3

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

ES 2 449 753 T3

Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu
260 265 270

Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp
275 280 285

Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn
290 295 300

Pro Asp His His His His His His
305 310

<210> 4
<211> 27
5 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Cebador sintético
<400> 4

cctgacatcc caccgcaggt tcagaag
27

15 <210> 5
<211> 27
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Cebador sintético
<400> 5

gaacgtgcgg tgggatgtca ggattgc
27

25 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético
35 <400> 6

atacacttga gtgacaatga ca
22

<210> 7
40 <211> 28
<212> ADN

ES 2 449 753 T3

<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Cebador sintético
5 <400> 7
aaaattccaa cacactactt tgcaatct
28
<210> 8
10 <211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
<220>
15 <223> Cebador sintético
<400> 8
ggatccttca acccgcgat tccgcccac gttcagaagt cggtt
45
20 <210> 9
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
25 <220>
<223> Cebador sintético
<400> 9
gcgttcgaac tagtcaggat tgctggtggt atattc
36
30 <210> 10
<211> 323
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
35 <220>
<223> Polipéptido sintético
<400> 10
40 Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu
1 5 10 15

ES 2 449 753 T3

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

ES 2 449 753 T3

Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp
 245 250 255

Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr
 260 265 270

His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys
 275 280 285

Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser
 290 295 300

Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser
 305 310 315 320

Asn Pro Asp

<210> 11
 <211> 187
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 11

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 His His His His His Gly Gly Ser Phe
 35 40 45

Asn Pro Arg Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met
 50 55 60

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys
 65 70 75 80

ES 2 449 753 T3

Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met
 85 90 95

Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys
 100 105 110

Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val
 115 120 125

Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala
 130 135 140

Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 145 150 155 160

Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile
 165 170 175

Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 180 185

5 <210> 12
 <211> 54
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 12

gacaggatcc tagtgatgat ggtggtgatg gtcaggattg ctggtgttat attc
 54

15 <210> 13
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Cebador sintético

<400> 13

25 <210> 14
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

30

ES 2 449 753 T3

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 14

5

ggatccttca acccgcgtat tccgccgcac gttcagaagt cggtt
45

<210> 15
<211> 36
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10

<220>
<223> Cebador sintético

15

<400> 15

gcgttcgaac tagtcaggat tgctggtggt atattc
36

<210> 16
<211> 348
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20

<220>
<223> Polipéptido sintético

25

<400> 16

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 His His His His His His Gly Gly Ser Phe
35 40 45

Asn Pro Arg Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met
50 55 60

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys
65 70 75 80

30

ES 2 449 753 T3

Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met
 85 90 95
 Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys
 100 105 110
 Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val
 115 120 125
 Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala
 130 135 140
 Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr
 145 150 155 160
 Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile
 165 170 175
 Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val
 180 185 190
 Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys
 195 200 205
 Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp
 210 215 220
 Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys
 225 230 235 240
 Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys
 245 250 255
 Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val
 260 265 270
 Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr
 275 280 285
 Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp
 290 295 300

ES 2 449 753 T3

Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu
305 310 315 320

Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile
325 330 335

Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
340 345

<210> 17

<211> 99

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

10 <400> 17

cgcagatctg cggccgcatg acggcgccct gggtgccct cgcctctc tggggatcgc
60

tgtgcgcagg atcaggatca gaacagaagc tgatcagcg
99

<210> 18

15 <211> 99

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador sintético

<400> 18

ccgtgatcag cttctgttct gatcctgac ctgcgcacag cgatccccag aggagggcga
60

gggccaccca gggcgccgtc atgcggccgc agatctggc
99

25

<210> 19

<211> 59

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Cebador sintético

<400> 19

35

ggcagatctc cgaggaagat ttactagggc gtggggaggc tgagacacgg gagtgcac

59

<210> 20

ES 2 449 753 T3

<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador sintético
<400> 20

ccgactagtg ggggctgtcg ggggtggctc
30

10 <210> 21
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador sintético

20 <400> 21

ccgactagtg ggcgtgggga ggctgagac
29

25 <210> 22
<211> 53
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Cebador sintético
0

30 <400> 22

cgctggatcc ctaatggtga tgatggtgat ggggtggggc tgtcgggggt ggc
53

35 <210> 23
<211> 269
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Polipéptido sintético

45 <400> 23

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
1 5 10 15

ES 2 449 753 T3

Ala Gly Ser Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu
 20 25 30

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 35 40 45

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 50 55 60

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 85 90 95

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 115 120 125

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 130 135 140

Ala Pro Thr Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr
 145 150 155 160

Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu
 165 170 175

Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp
 180 185 190

Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu
 195 200 205

Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu
 210 215 220

Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu
 225 230 235 240

ES 2 449 753 T3

Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu
 245 250 255

Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr His His His His His His
 260 265

<210> 24
 <211> 153
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 24

Met Thr Ala Pro Trp Val Ala Leu Ala Leu Leu Trp Gly Ser Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Gly Ser Gly Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Leu
 20 25 30

Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn
 35 40 45

Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly
 50 55 60

Glu Gln Asp Lys Arg Leu His Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser
 65 70 75 80

Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn
 85 90 95

Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val
 100 105 110

Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His
 115 120 125

Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr
 130 135 140

Ala Pro Thr His His His His His His
 145 150

<210> 25
 <211> 33

ES 2 449 753 T3

<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 25

gcgaagctta tgcctcagct atacatttac atc
33

10 <210> 26
<211> 30
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 26

20 cggcctccgg atgctgcat caaaaaacgg
30

<210> 27
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Cebador sintético

30 <400> 27

ccgcgcgccc gcagaatctg gatagtatgc ttc
33

<210> 28
<211> 55
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Cebador sintético

40 <400> 28

cgacaggatc ctagtgatga tgggtggtgat gtcgaatgct gccatcaaaa aacgg
55

45 <210> 29
<211> 287
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Polipéptido sintético

<400> 29

ES 2 449 753 T3

Met Pro Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30

Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
 35 40 45

Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60

Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
 65 70 75 80

His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
 85 90 95

Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
 100 105 110

Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
 115 120 125

Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
 130 135 140

Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly
 165 170 175

ES 2 449 753 T3

Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys
 180 185 190

Ser Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn
 195 200 205

Gly His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr
 210 215 220

Leu Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys
 225 230 235 240

Asp Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr
 245 250 255

Asn Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile
 260 265 270

Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg His His His His His His
 275 280 285

- 5 <210> 30
- <211> 158
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 30

Met Pro Gln Leu Tyr Ile Tyr Ile Arg Leu Leu Gly Ala Tyr Leu Phe
 1 5 10 15

Ile Ile Ser Arg Val Gln Gly Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly
 20 25 30

Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val
 35 40 45

Thr Leu Ala Pro Glu Asp Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser
 50 55 60

ES 2 449 753 T3

Gly His Cys Pro Asp Asp Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly
65 70 75 80

His Cys Phe Ala Ile Ile Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu
85 90 95

Ala Ser Gly Cys Met Lys Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp
100 105 110

Ser Pro Lys Ala Gln Leu Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn
115 120 125

Leu Cys Asn Gln Tyr Leu Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly
130 135 140

Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg His His His His His His
145 150 155

5 <210> 31
<211> 25
<212> PRT
<213> Homo sapiens

10 <400> 31

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
1 5 10 15

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
20 25

15 <210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Homo Sapien
<400> 32

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
1 5 10

20 <210> 33
<211> 50
<212> PRT
<213> Homo sapiens

25 <400> 33

ES 2 449 753 T3

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys
 1 5 10 15

Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg
 20 25 30

His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys
 35 40 45

Phe Pro
 50

5 <210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 34

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 1 5 10

<210> 35
 <211> 8
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens

<400> 35

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr
 1 5

20 <210> 36
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 36

Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu
 1 5 10

30 <210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 37

Ala Ile Leu Gly Arg Ser Glu
 1 5

40 <210> 38
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 449 753 T3

<400> 38

Glu Met Glu Val Thr Gln Pro Thr Ser Asn Pro Val Thr Pro Lys Pro
 1 5 10 15

Pro Tyr Tyr Asn Ile
 20

5 <210> 39
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 39

Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 1 5

<210> 40
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 40

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 1 5 10 15

20 Thr

<210> 41
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 41

Gln Asn Leu Asp Ser Met Leu His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser
 1 5 10 15

30 Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp
 20 25 30

<210> 42
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35 <400> 42

Pro Val Val Ile Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg
 1 5 10

40 <210> 43
 <211> 101

ES 2 449 753 T3

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 43

5

```

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

<210> 44
 <211> 101
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 44

ES 2 449 753 T3

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln
 1 5 10 15

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
 20 25 30

Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
 35 40 45

Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile
 50 55 60

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys
 65 70 75 80

Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
 85 90 95

Asp Asn Ile Ile Phe
 100

<210> 45
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 45

Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys
 1 5 10 15

Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys
 20 25 30

Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg
 35 40 45

Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr
 50 55 60

Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu
 65 70 75

<210> 46
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

15

ES 2 449 753 T3

<400> 46

Thr Gln Glu Cys Leu Phe Phe Asn Ala Asn Trp Glu Lys Asp Arg Thr
1 5 10 15

Asn Gln Thr Gly Val Glu Pro Cys Tyr Gly Asp Lys Asp Lys Arg Arg
20 25 30

His Cys Phe Ala Thr Trp Lys Asn Ile Ser Gly Ser Ile Glu Ile Val
35 40 45

Lys Gln Gly Cys Trp Leu Asp Asp Ile Asn Cys Tyr Asp Arg Thr Asp
50 55 60

Cys Val Glu Lys Lys Asp Ser Pro Glu Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu
65 70 75 80

Gly Asn Met Cys Asn Glu Lys Phe Ser Tyr Phe Pro
85 90

<210> 47
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 47

5

Arg Glu Cys Ile Tyr Tyr Asn Ala Asn Trp Glu Leu Glu Arg Thr Asn
1 5 10 15

Gln Ser Gly Leu Glu Arg Cys Glu Gly Glu Gln Asp Lys Arg Leu His
20 25 30

Cys Tyr Ala Ser Trp Arg Asn Ser Ser Gly Thr Ile Glu Leu Val Lys
35 40 45

Lys Gly Cys Trp Leu Asp Asp Phe Asn Cys Tyr Asp Arg Gln Glu Cys
50 55 60

Val Ala Thr Glu Glu Asn Pro Gln Val Tyr Phe Cys Cys Cys Glu Gly
65 70 75 80

Asn Phe Cys Asn Glu Arg Phe Thr His Leu Pro Glu Ala Gly Gly Pro
85 90 95

Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro Thr
100 105

ES 2 449 753 T3

<210> 48
 <211> 98
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 48

```

    Thr Leu Pro Phe Leu Lys Cys Tyr Cys Ser Gly His Cys Pro Asp Asp
    1           5           10           15

    Ala Ile Asn Asn Thr Cys Ile Thr Asn Gly His Cys Phe Ala Ile Ile
           20           25           30

    Glu Glu Asp Asp Gln Gly Glu Thr Thr Leu Ala Ser Gly Cys Met Lys
           35           40           45

    Tyr Glu Gly Ser Asp Phe Gln Cys Lys Asp Ser Pro Lys Ala Gln Leu
           50           55           60

    Arg Arg Thr Ile Glu Cys Cys Arg Thr Asn Leu Cys Asn Gln Tyr Leu
           65           70           75           80

    Gln Pro Thr Leu Pro Pro Val Val Ile Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser
           85           90           95

    Ile Arg
    
```

10 <210> 49
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 49

```

    Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
    1           5           10           15

    Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
           20           25           30

    Lys Phe Pro
           35
    
```

20 <210> 50
 <211> 60
 <212> PRT

ES 2 449 753 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 50

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
1 5 10 15

Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro
20 25 30

Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met
35 40 45

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
50 55 60

10

<210> 51

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 51

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
1 5 10 15

20

Thr Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
20 25

<210> 52

<211> 44

<212> PRT

25

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 52

ES 2 449 753 T3

Pro Val Val Ile Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Gln Asn Leu
1 5 10 15

Asp Ser Met Leu His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys
20 25 30

Lys Ser Glu Asn Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp
35 40

5 <210> 53
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Polipéptido sintético
<400> 53

Pro Val Val Ile Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Gly Asn Leu
1 5 10 15

Asp Ser Met Leu His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys
20 25 30

Lys Ser Glu Asn Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp
35 40

15 <210> 54
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Polipéptido sintético
<400> 54

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Pro Pro His Val Gln
1 5 10 15

Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
20 25 30

25 Lys Phe Pro
35
<210> 55
<211> 25
<212> PRT

30 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5 <400> 55

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Gly Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
1 5 10 15

Thr Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
20 25

<210> 56

<211> 60

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15 <400> 56

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Arg His Val Gln
1 5 10 15

~~Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro~~
~~20 25 30~~

Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met
35 40 45

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
50 55 60

20

<210> 57

<211> 35

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 57

30

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Pro His Val Gln
1 5 10 15

Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
20 25 30

Lys Phe Pro
35

<210> 58

ES 2 449 753 T3

<211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 58
 Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Arg His Val Gln
 1 5 10 15
 Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
 20 25 30
 Lys Phe Pro
 35
 10 <210> 59
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 59
 20 Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Gly Gly Gly Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro
 20 25 30
 Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met
 35 40 45
 Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 50 55 60
 25 <210> 60
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 30 <400> 60

ES 2 449 753 T3

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
 20 25 30

Lys Phe Pro
 35

5 <210> 61
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 61

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
 20 25 30

Lys Phe Pro
 35

15 <210> 62
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

<400> 62

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
 1 5 10 15

Lys Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asn Asn Asp Met
 35 40 45

25 Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 50 55 60

ES 2 449 753 T3

<210> 63
 <211> 60
 <212> PRT

5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 63

```

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly
1          5          10          15
-----
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
          20          25          30
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Asn Asn Asp Met
          35          40          45

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
          50          55          60
    
```

15 <210> 64
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <400> 64

```

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
1          5          10          15
Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val
          20          25          30

Lys Phe Pro
          35
    
```

30 <210> 65
 <211> 48
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

35 <400> 65

ES 2 449 753 T3

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
 1 5 10 15

Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 20 25 30

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45

5 <210> 66
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 10 <223> Polipéptido sintético
 <400> 66

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val
 1 5 10 15

Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 20 25 30

15 <210> 67
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Polipéptido sintético
 <400> 67

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile
 20 25 30

Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40

30 <210> 68
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

ES 2 449 753 T3

<400> 68

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn
 20 25 30

5

Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 35 40 45

<210> 69

<211> 60

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

15

<400> 69

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
 1 5 10 15

Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro
 20 25 30

Ser Cys Asn Arg Thr Ala His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met
 35 40 45

Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro
 50 55 60

20

<210> 70

<211> 53

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 70

ES 2 449 753 T3

Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln
 1 5 10 15

Lys Ser Asp Val Glu Met Glu Ala Gln Lys Asp Glu Arg Thr Ala His
 20 25 30

Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn Gly
 35 40 45

Ala Val Lys Phe Pro
 50

5 <210> 71
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Polipéptido sintético
 <400> 71

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 1 5 10 15

Thr Ser Gly Arg Gly Glu Ala Glu Thr
 20 25

15 <210> 72
 <211> 35
 <212> PRT

20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Polipéptido sintético

25 <400> 72

Glu Ala Gly Gly Pro Glu Val Thr Tyr Glu Pro Pro Pro Thr Ala Pro
 1 5 10 15

Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Arg Gly Glu
 20 25 30

Ala Glu Thr
 35

30 <210> 73
 <211> 44
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 73

Pro Val Val Ile Gly Pro Phe Phe Asp Gly Ser Ile Arg Gln Asn Leu
1 5 10 15

Asp Ser Met Leu His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys
20 25 30

Lys Ser Glu Asn Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp
35 40

10

<210> 74

<211> 40

<212> PRT

15

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

20

<400> 74

Pro Val Val Ile Gly Pro Asp Gly Ser Ile Arg Gln Asn Leu Asp Ser
1 5 10 15

His Gly Thr Gly Met Lys Ser Asp Ser Asp Gln Lys Lys Ser Glu Asn
20 25 30

Gly Val Thr Leu Ala Pro Glu Asp
35 40

25

<210> 75

<211> 212

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

30

<400> 75

ES 2 449 753 T3

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
 20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
 35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 50 55 60

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
 65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly
 85 90 95

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser
 100 105 110

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser
 115 120 125

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn
 130 135 140

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
 165 170 175

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
 180 185 190

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
 195 200 205

Ser Asn Pro Asp
 210

5 <210> 76
 <211> 212
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

5

<400> 76

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
1 5 10 15

ES 2 449 753 T3

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

<210> 77
 <211> 360
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

ES 2 449 753 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 77

5

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
 20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
 35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 50 55 60

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
 65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly
 85 90 95

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser
 100 105 110

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser
 115 120 125

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn
 130 135 140

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
 165 170 175

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
 180 185 190

ES 2 449 753 T3

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
 195 200 205

Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
 225 230 235 240

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
 245 250 255

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
 260 265 270

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
 275 280 285

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
 290 295 300

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
 305 310 315 320

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
 325 330 335

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
 340 345 350

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 355 360

- <210> 78
- 5 <211> 373
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 78

ES 2 449 753 T3

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
50 55 60

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly
85 90 95

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser
100 105 110

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser
115 120 125

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn
130 135 140

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro
145 150 155 160

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
165 170 175

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
180 185 190

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
195 200 205

Ser Asn Pro Asp Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Asp Val Glu Met
210 215 220

ES 2 449 753 T3

Glu Ala Gln Lys Asp Glu Ile Ile Cys Pro Ser Cys Asn Arg Thr Ala
225 230 235 240

His Pro Leu Arg His Ile Asn Asn Asp Met Ile Val Thr Asp Asn Asn
245 250 255

Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe
260 265 270

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
275 280 285

Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
290 295 300

Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
305 310 315 320

Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
325 330 335

Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
340 345 350

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
355 360 365

Thr Ser Asn Pro Asp
370

- <210> 79
- 5 <211> 448
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 10 <223> Polipéptido sintético
- <400> 79

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
1 5 10 15

15

ES 2 449 753 T3

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

ES 2 449 753 T3

Gly Gly Gly Ser Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp
 245 250 255

Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu
 260 265 270

Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp
 275 280 285

Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr
 290 295 300

Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys
 305 310 315 320

Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe
 325 330 335

Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn
 340 345 350

Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys
 355 360 365

Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile
 370 375 380

Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe
 385 390 395 400

Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys
 405 410 415

Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys
 420 425 430

Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 435 440 445

<210> 80

<211> 448

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

ES 2 449 753 T3

<220>

<223> Polipéptido sintético

<400> 80

5

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
50 55 60

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asn Gly
85 90 95

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser
100 105 110

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser
115 120 125

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn
130 135 140

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro
145 150 155 160

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
165 170 175

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
180 185 190

ES 2 449 753 T3

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
 195 200 205

Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 225 230 235 240

Gly Gly Gly Ser Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp
 245 250 255

Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu
 260 265 270

Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp
 275 280 285

Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr
 290 295 300

Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys
 305 310 315 320

Ile Glu Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asn Gly Ala Val Lys Phe
 325 330 335

Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn
 340 345 350

Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys
 355 360 365

Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile
 370 375 380

Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe
 385 390 395 400

Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys
 405 410 415

ES 2 449 753 T3

Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys
 420 425 430

Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 435 440 445

<210> 81
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10

<400> 81

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
 20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
 35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 50 55 60

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
 65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asn Gly
 85 90 95

Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe Ser
 100 105 110

Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser
 115 120 125

Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys Asn
 130 135 140

15

ES 2 449 753 T3

Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu Pro
 145 150 155 160

Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile Met
 165 170 175

Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser
 180 185 190

Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn Thr
 195 200 205

Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val Thr
 225 230 235 240

Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp
 245 250 255

Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys
 260 265 270

Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val
 275 280 285

Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp
 290 295 300

Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro
 305 310 315 320

Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met
 325 330 335

Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu
 340 345 350

Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 355 360 365

ES 2 449 753 T3

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Gln Cys
 370 375 380

Phe Cys His Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly
 385 390 395 400

Leu Cys Phe Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn
 405 410 415

Ser Met Cys Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe
 420 425 430

Val Cys Ala Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys
 435 440 445

Cys Asn Gln Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys
 450 455 460

Ser Ser Pro Gly Leu Gly Pro Val Glu
 465 470

<210> 82
 <211> 473
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Polipéptido sintético

10 <400> 82

Ala Ala Leu Leu Pro Gly Ala Thr Ala Leu Gln Cys Phe Cys His Leu
 1 5 10 15

Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe Val
 20 25 30

Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys Ile
 35 40 45

Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala Pro
 50 55 60

ES 2 449 753 T3

Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln Asp
65 70 75 80

His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Pro Thr Thr Val Lys Ser Ser Pro Gly
85 90 95

Leu Gly Pro Val Glu Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
100 105 110

Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Leu Gln Cys Phe Cys His
115 120 125

Leu Cys Thr Lys Asp Asn Phe Thr Cys Val Thr Asp Gly Leu Cys Phe
130 135 140

Val Ser Val Thr Glu Thr Thr Asp Lys Val Ile His Asn Ser Met Cys
145 150 155 160

Ile Ala Glu Ile Asp Leu Ile Pro Arg Asp Arg Pro Phe Val Cys Ala
165 170 175

Pro Ser Ser Lys Thr Gly Ser Val Thr Thr Thr Tyr Cys Cys Asn Gln
180 185 190

Asp His Cys Asn Lys Ile Glu Leu Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asn
195 200 205

Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Phe
210 215 220

Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr
225 230 235 240

Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala Val Trp Arg Lys
245 250 255

Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His Asp Pro Lys Leu
260 265 270

Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser Pro Lys Cys Ile
275 280 285

ES 2 449 753 T3

Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys
 290 295 300

Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Asn
 305 310 315 320

Thr Ser Asn Pro Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Ser Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
 340 345 350

Thr Asp Asn Asn Gly Ala Val Lys Phe Pro Gln Leu Cys Lys Phe Cys
 355 360 365

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
 370 375 380

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
 385 390 395 400

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
 405 410 415

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
 420 425 430

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
 435 440 445

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
 450 455 460

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
 465 470

<210> 83
 <211> 10
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador sintético

10 <400> 83

ES 2 449 753 T3

Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 1 5 10
 <210> 84
 <211> 50
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador sintético
 10 <400> 84
 Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Asn Cys Ser Pro Cys Ile Ile
 20 25 30
 Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met Glu Val Asp Ser Lys Gln Val His Pro
 35 40 45
 Pro Ile
 50
 <210> 85
 15 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Enlazador sintético
 <400> 85
 Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 1 5 10
 <210> 86
 25 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> Enlazador sintético
 <400> 86
 Thr Ala Gly Pro Leu Leu Ala Ala
 1 5
 <210> 87
 <211> 14
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

<400> 87

5

Glu Val Pro Gly Leu Gly Pro Ser Ser Lys Val Thr Thr Pro
1 5 10

<210> 88
<211> 7
<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

15 <400> 88

Glu Ser Arg Gly Leu Ile Ala
1 5

<210> 89
<211> 21
<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

25 <400> 89

Ile Asn Tyr Tyr Pro Pro Lys Pro Thr Val Pro Asn Ser Thr Pro Gln
1 5 10 15

Thr Val Glu Met Glu
20

30 <210> 90
<211> 8
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Enlazador sintético

<400> 90

Thr Glu Ala Glu Gly Arg Gly Ser
1 5

40 <210> 91
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Enlazador sintético

<400> 91

ES 2 449 753 T3

Thr Pro Ala Thr Pro Pro Pro Glu Tyr Thr Val Glu Pro Gly Gly Ala
 1 5 10 15

Glu

5 <210> 92
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador sintético
 10 <400> 92

Asp Glu Pro Ala Leu Thr Val Gly Asn Glu Ser Lys Lys Gln Asp Ser
 1 5 10 15

Asp Ser Lys Met Gly Thr Gly His Leu Met Ser Asp Leu Asn Gln
 20 25 30

15 <210> 93
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador sintético
 <400> 93

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

Glu Glu Ser
 35

25 <210> 94
 <211> 60
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador sintético
 35 <400> 94

ES 2 449 753 T3

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
1 5 10 15

Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Asn Cys Ser Pro Cys Ile Ile
20 25 30

Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met Glu Val Asp Ser Lys Gln Val His Pro
35 40 45

Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
50 55 60

5 <210> 95
<211> 25
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador sintético
<400> 95

Thr Glu Ala Glu Gly Arg Gly Ser Thr Pro Ala Thr Pro Pro Pro Glu
1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Pro Gly Gly Ala Glu
20 25

20 <210> 96
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

25 <400> 96

Asp Glu Pro Ala Leu Thr Val Gly Asn Glu Ser Lys Lys Gln Asp Ser
1 5 10 15

Asp Ser Lys Met Gly Thr Gly His Leu Met Ser Asp Leu Asn Gln Arg
20 25 30

Ile Ser Gly Asp Phe Phe Pro Gly Ile Val Val Pro
35 40

30 <210> 97
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

ES 2 449 753 T3

<220>

<223> Enlazador sintético

<400> 97

5

Asp Glu Pro Ala Leu Thr Val Gly Asn Glu Ser Lys Lys Gln Asp Ser
1 5 10 15

Asp Ser Lys Met Gly Thr Gly His Leu Met Ser Asp Leu Asn Gly Arg
20 25 30

Ile Ser Gly Asp Phe Phe Pro Gly Ile Val Val Pro
35 40

<210> 98

<211> 35

10 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Enlazador sintético

15

<400> 98

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
20 25 30

Glu Glu Ser
35

20

<210> 99

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Enlazador sintético

<400> 99

Thr Glu Ala Glu Gly Arg Gly Ser Thr Pro Ala Thr Pro Pro Pro Glu
1 5 10 15

Gly Thr Val Glu Pro Gly Gly Ala Glu
20 25

30

<210> 100

<211> 60

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 100

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Asn Cys Ser Pro Cys Ile Ile
 20 25 30

10

Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met Glu Val Asp Ser Lys Gln Val His Arg
 35 40 45

Gly Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 50 55 60

<210> 101
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Enlazador sintético

20

<400> 101

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Gly Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

Glu Glu Ser
 35

25 <210> 102
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 102

ES 2 449 753 T3

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Arg Gly Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

Glu Glu Ser
 35

5 <210> 103
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador sintético
 <400> 103

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Asn Cys Ser Pro Cys Ile Ile
 20 25 30

Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45

15 Gly Gly Ser Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 50 55 60

<210> 104
 <211> 35
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador sintético

25 <400> 104

ES 2 449 753 T3

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

Glu Glu Ser
 35

5 <210> 105
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 105

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30

Glu Glu Ser
 35

20 <210> 106
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 106

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20 25 30

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Lys Gln Val His Pro
 35 40 45

Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 50 55 60

<210> 107
 <211> 60
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador sintético
 <400> 107
 10 Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 20 25 30
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly
 35 40 45
 Gly Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 50 55 60
 15 <210> 108
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> Enlazador sintético
 <400> 108
 Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15
 Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Glu Glu Ser
 25 35
 <210> 109
 <211> 48
 <212> PRT
 30 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador sintético
 35 <400> 109

ES 2 449 753 T3

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Met Asp Asn Asn Val Ser Lys
 20 25 30

Gln Val His Pro Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 35 40 45

5 <210> 110
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 110

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 20 25 30

15 <210> 111
 <211> 43
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 111

25 Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 20 25 30

Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 35 40

30 <210> 112
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador sintético

35

ES 2 449 753 T3

<400> 112

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 20 25 30

Gly Ser Gly Gly Gly Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 35 40 45

5 <210> 113
 <211> 60
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 113

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Asn Cys Ser Pro Cys Ile Ile
 20 25 30

Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met Glu Val Asp Ser Lys Gln Val His Pro
 35 40 45

15 Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr Asn Tyr Glu Glu Ser
 50 55 60

<210> 114
 <211> 53
 <212> PRT
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Enlazador sintético

25 <400> 114

ES 2 449 753 T3

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
 1 5 10 15

Ile His Arg Leu Pro His Ala Thr Arg Glu Asp Lys Gln Ala Glu Met
 20 25 30

Glu Val Asp Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile Asp Pro Asn Ser Thr
 35 40 45

Asn Tyr Glu Glu Ser
 50

5 <210> 115
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 115

Thr Glu Ala Glu Gly Arg Gly Ser Thr Pro Ala Thr Pro Pro Pro Glu
 1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Pro Gly Gly Ala Glu
 20 25

15 <210> 116
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Enlazador sintético

<400> 116

25 Thr Glu Ala Glu Gly Arg Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 1 5 10 15

Gly Gly Thr Pro Ala Thr Pro Pro Pro Glu Tyr Thr Val Glu Pro Gly
 20 25 30

Gly Ala Glu
 35

30 <210> 117
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

ES 2 449 753 T3

<220>
<223> Enlazador sintético

<400> 117

5

```

Asp Glu Pro Ala Leu Thr Val Gly Asn Glu Ser Lys Lys Gln Asp Ser
1          5          10          15
-----
Asp Ser Lys Met Gly Thr Gly His Leu Met Ser Asp Leu Asn Gln Arg
          20          25          30
Ile Ser Gly Asp Phe Phe Pro Gly Ile Val Val Pro
          35          40
    
```

10 <210> 118
<211> 40
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Enlazador sintético

<400> 118

```

Asp Glu Pro Ala Leu Thr Val Gly Asn Glu Ser Lys Lys Gln Asp Ser
1          5          10          15
-----
Asp Ser Lys Met Gly Thr Gly His Ser Asp Leu Asn Gln Arg Ile Ser
          20          25          30
Gly Asp Pro Gly Ile Val Val Pro
          35          40
    
```

20 <210> 119
<211> 25
<212> PRT
25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

30 <220>
<221> 223
<222> (1)..(25)
<223> Enlazador sintético 1; corresponde a la sec. con núm. de ident. 82 como se refiere en el documento WO 2008/113185 en la página 46 línea 8

35 <400> 119

```

Pro Phe Lys Val Ala Gly Asn Asn Asp Thr Val Ile Met Asp Asn Asn
1          5          10          15
-----
Val Ser Lys Gln Val His Pro Pro Ile
          20          25
    
```

<210> 120
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador sintético

10 <220>
<221> 223
<222> (1) .. (13)
<223> Enlazador sintético 38; corresponde a la sec. con núm. de ident. 92 como se refiere en el documento WO
2008/113185 en la Tabla II en la página 46 línea 20

15 <400> 120

Arg Ile Ser Gly Asp Phe Phe Pro Gly Ile Val Val Pro
1 5 10

20

Reivindicaciones

1. Agente de unión bivalente de la estructura general II con afinidad por un miembro de la superfamilia TGF-β:



donde:

bd1 y bd2 son los mismos y son dominios de unión al polipéptido con una afinidad por el mismo miembro de la superfamilia TGF-β; y, el enlazador comprende la sec. con núm. de ident.: 49 o sec. con núm. de ident.: 50.

2. El agente de la reivindicación 1, en donde el miembro de la superfamilia TGF-β por el cual los dominios de unión tienen afinidad se selecciona del grupo que consiste de: TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, activina βA, activina βB, activina βC, activina βE, proteína morfogénica ósea (BMP) 2, BMP 3, BMP 4, BMP 5, BMP 6, BMP 7, BMP 8, BMP 9, BMP 10, BMP 11, BMP 12, BMP 13, BMP 14, BMP 15, factor de diferenciación de crecimiento (GDF) 1, GDF 3, GDF 8, GDF 9, GDF 15, Nodal, Inhibina α, hormona antimülleriana, Lefty 1, Lefty 2, arteman, persefina y neuriturina.

3. El agente de la reivindicación 1, en donde el miembro de la superfamilia TGF-β por el cual los dominios de unión tienen afinidad se selecciona del grupo que consiste de: TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, BMP 2, GDF 8, y activina.

4. El agente de la reivindicación 1, en donde bd1 y bd2 son la sec. con núm. de ident.: 43, sec. con núm. de ident.: 44, sec. con núm. de ident.: 45, sec. con núm. de ident.: 46, sec. con núm. de ident.: 47 o sec. con núm. de ident.: 48.

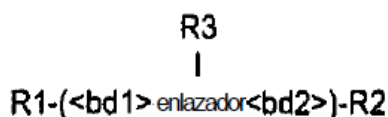
5. El agente de la reivindicación 1, en donde bd1 y bd2 son la sec. con núm. de ident.: 43 o sec. con núm. de ident.: 44.

6. El agente de la reivindicación 1 que es la sec. con núm. de ident.: 10 o sec. con núm. de ident.: 16.

7. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que no está fusionado a una porción de dimerización o multimerización.

8. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 que tiene una masa después de la glicosilación de entre 40 kDa y 60 kDa.

9. El agente de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 que tiene la estructura general V:



en donde R1, R2 y R3 pueden ser iguales o diferentes, pueden no estar presentes y, cuando están presentes, pueden ser independientemente uno o más de una proteína de fusión para dirigir, un anticuerpo de dominio sencillo, un agente de radioterapia, un agente de imagen, un colorante fluorescente, una etiqueta de la proteína fluorescente, un agente citotóxico para la quimioterapia, un polímero conjugado a fármacos, un agente estabilizante, un fármaco, un nanoportador, un soporte o un dendrímero.

10. El agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para usar en la modulación de la respuesta de una célula a un miembro de la superfamilia TGF-β en su medio ambiente, dicho método comprende exponer la célula a dicho agente.

11. Uso de un agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para concentrar el ligando en una muestra.

12. Uso de un agente como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para la purificación del ligando in vitro.

5

13. El agente como se define en la reivindicación 9 para usar en el diagnóstico de una afección **caracterizado en** todo o parte por una anomalía a niveles de uno o más miembros de la superfamilia TGF- β en el cuerpo o una porción de este.
14. El agente como se define en la reivindicación 9 para usar en la entrega dirigida de un compuesto a un sitio de interés dentro de un cuerpo.

Figura 1A: Secuencias de aminoácido correspondientes a regiones intrínsecamente no estructuradas en las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF-β seleccionados.

Receptor - superfamilia TGFβ	Secuencias correspondientes a regiones extracelulares no estructuradas	
TβR-II Humano	¹ IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ²⁵ ¹²⁷ SEEYNTSNPD ¹³⁶	Sec. con núm. de ident. 31 Sec. con núm. de ident. 32
TβR-IIb Humano	¹ IPPHVQKSDVMEAEQKDELICPSCNRTAHLRHNNDMIVTDNNGAVKFP ⁵⁰ Sec. con núm. de ident. 33 ¹⁵² SEEYNTSNPD ¹⁶¹	Sec. con núm. de ident. 34
TβR-I Humano	¹ ALLPGAT ⁸ ⁸⁹ PTTVKSSPGLGPVE ¹⁰¹	Sec. con núm. de ident. 35 Sec. con núm. de ident. 36
ActR-IIa Humano	¹ AILGRSE ⁷ ⁹⁵ EMEVTQPTSNPVTPKPPYYNI ¹²⁰	Sec. con núm. de ident. 37 Sec. con núm. de ident. 38
ActR-IIb Humano	¹ SRGEAET ⁸ ⁹⁹ EAGGPEVTYEPPTAPT ¹¹⁶	Sec. con núm. de ident. 39 Sec. con núm. de ident. 40
BMPR-1a Humano	¹ QNLDSMLHGTGMKSDSDQKKSNGVTLAPED ³¹ ¹¹⁷ PVVIGPFFDGSIR ¹²⁹	Sec. con núm. de ident. 41 Sec. con núm. de ident. 42

Nota: La numeración del residuo comienza después del péptido señal.

Figura 1B: Secuencias de aminoácido correspondientes a regiones estructuradas del dominio de unión de ligandos en las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF-β seleccionados.

Receptor - superfamilia -TGFβ	Secuencias correspondientes a regiones estructuradas (dominios de unión de ligandos)
TβR-II Humano	²⁶ QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCISITICEKPOEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPCKIMKERKKPGETFFMCSSESSDECNDNIIF ¹²⁶ Sec. con núm. de ident. 43
TβR-IIb Humano	⁵¹ QLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCISITICEKPOEVCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILE DAASPCKIMKERKKPGETFFMCSSESSDECNDNIIF ¹⁵¹ Sec. con núm. de ident. 44
TβR-I Humano	⁹ ALQCFCHLCTKDNFTCVTDGLCFVSVTETTDKVIHNSMCIAEIDLIPDRPFVCAFSKTSVTTY CCNQDHCNKIEL ⁹⁷ Sec. con núm. de ident. 45
ActR-IIa Humano	⁸ TQECLEFFNANWEKDRNTQTVGVEPCYGDKDKRRRHCFAWKNISSGSIIVKQGCWLDINCYDRDCVE KKDSPEVYFCCCEGNCNEKFSYFP ⁹⁸ Sec. con núm. de ident. 46
ActR-IIb Humano	⁹ RECIYYNANWELERTNQSGLERCEGEQDKRLHCYASWRNSSGTIELYKKGWLDDENCYDRQCVAT EENPQVYFCCCEGNCNERTHLPEAGGPEVTYEPPPTAPT ⁹⁹ Sec. con núm. de ident 47
BMPR-1a Humano	¹² TLPFLKCYCSGHCPDDAINNTCITNGHCFAIIEEDDQGETTLASGCMKYEGSPQCKDSPAQLRR TIECCRNLNCQYLQPTLPPVIGFFDGSIR ¹¹⁶ Sec. con núm. de ident. 48

Nota: La numeración de los residuos comienza después del péptido señal.

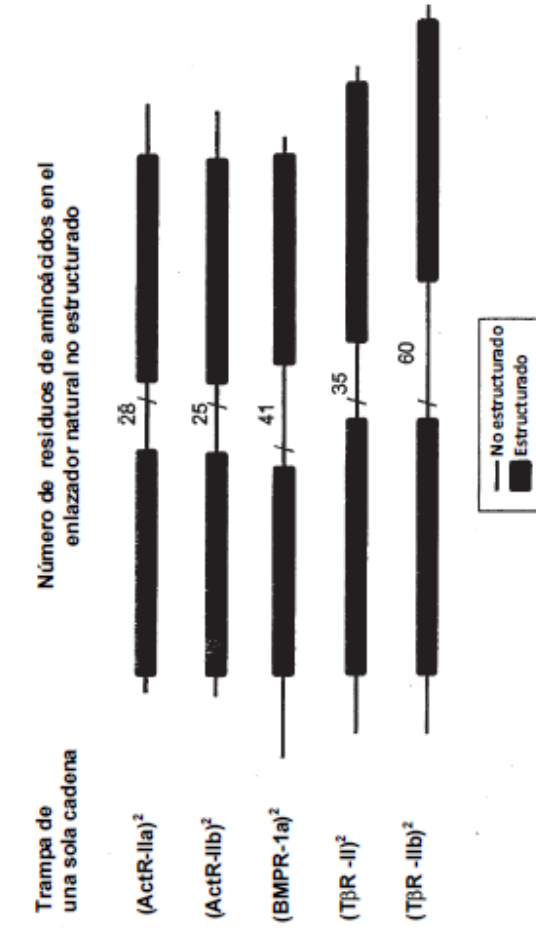


Figura 2A: Ejemplos de ectodominios de receptores fusionados en línea como trampas bivalentes de una sola cadena homo bivalente de varios factores de crecimiento de la familia TGF-β. El signo "n" indica el punto de fusión.

Figura 2B: Ejemplos de secuencias correspondientes a enlazadores naturales de trampas de una sola cadena homo bivalente resultantes de la fusión de la totalidad de las porciones extracelulares de los receptores de la superfamilia TGF- β -seleccionados.

Trampa de una sola cadena	Longitud del enlazador (a.a)	Enlazadores de secuencias naturales	Sec. con núm. de ident.
(TBR-II) ²	35	¹²⁷ SEEYNTSNPD: IPPHVQKSYNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁶¹	Sec. con núm. de ident. 49
(TBR-IIIb) ²	60	¹²⁷ SEEYNTSNPD: IPPHVQKSDVEMEAQKDEIICPSCNRFAHPLRHINNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁸⁷	Sec. con núm. de ident. 50
(ActR-IIb) ²	25	⁹⁹ EAGGPEVTYEPPTAPT: SGRGEAET ¹²⁴	Sec. con núm. de ident. 51
(BMPR-1a) ²	44	¹¹⁷ PVVIQFFEDGSIR: QNLDLMLHGTGKKSDDQKSENGVTILAFED ¹⁵⁰	Sec. con núm. de ident. 52

Nota: La numeración de los residuos corresponde a construcciones trampa y comienza después de la etiqueta N-terminal. La posición de fusión se indica por ()

Figura 2D: Ejemplos de secuencias correspondientes a diferentes longitudes del enlazador para trampas de una sola cadena homo-bivalente mediante la supresión o la repetición de secuencias naturales, o mediante la inserción de secuencias artificiales, en la secuencia enlazadora natural.

Trampa de una sola cadena	Longitud del enlazador (a.a)	Secuencias de enlazadores
(TβR -II) ²	35	¹²⁷ SEEYNTSNPDI ¹⁴⁴ PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁴⁴ Sec. con núm. de Ident. 64
(TβR -II) ² -repetición	48	¹²⁷ SEEYNTSNPDI ¹⁴⁴ PPHVQKSVNNDMIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁷⁴ Sec. con núm. de Ident. 65
(TβR -II) ² -supresión	33	¹²⁷ SEEYNTSN--PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁵⁹ Sec. con núm. de Ident. 66
(TβR -II) ² -G8	43	¹²⁷ SEEYNTSNPDGGGGGGGII ¹⁴⁹ PPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁴⁹ Sec. con núm. de Ident. 67
(TβR -II) ² -(G3S) ₃	47	¹²⁷ SEEYNTSNPDGGGGGGGGSS ¹⁷³ IPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁷³ Sec. con núm. de Ident. 68
(TβR -IIb) ²	60	¹²⁷ SEEYNTSNPDI ¹⁴⁴ PPHVQKSDVMEQAQKDEIICPCSNRTAHLRHNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁸⁷ Sec. con núm. de Ident. 69
(TβR -IIb) ² -supresión	53	¹²⁷ SEEYNTSNPDI ¹⁴⁴ PPHVQKSDVMEQAQKDE-----RTAHLRHNNDMIVTDNNGAVKFP ¹⁸⁰ Sec. con núm. de Ident. 70
(AcIR -IIb) ²	25	⁹⁹ EAGGPEVTYEPPPTAFTSGRGEAT ¹²⁴ Sec. con núm. de Ident. 71
(AcIR -IIb) ² -G10	35	⁹⁹ EAGGPEVTYEPPPTAFTGGGGGGGGSGRGEAT ¹³⁴ Sec. con núm. de Ident. 72
(BMPR-1a) ²	44	¹¹⁷ PVVVIGPFFDGSIRQMLDSMLHCTGMKSDSDOKKSENGVTLAPED ¹⁶⁰ Sec. con núm. de Ident. 73
(BMPR-1a) ² -supresión	40	¹¹⁷ PVVVIGS--DGSIRQMLDS--HCTGMKSDSDOKKSENGVTLAPED ¹⁵⁶ Sec. con núm. de Ident. 74

Nota: La numeración de los residuos corresponde a construcciones de trampas y comienza después de la etiqueta N-terminal. Las secuencias de aminoácidos añadidas, ya sean naturales o artificiales, están subrayadas. Las eliminaciones se indican por guiliones. Las secuencias de los enlazadores naturales se incluyen además como referencia.

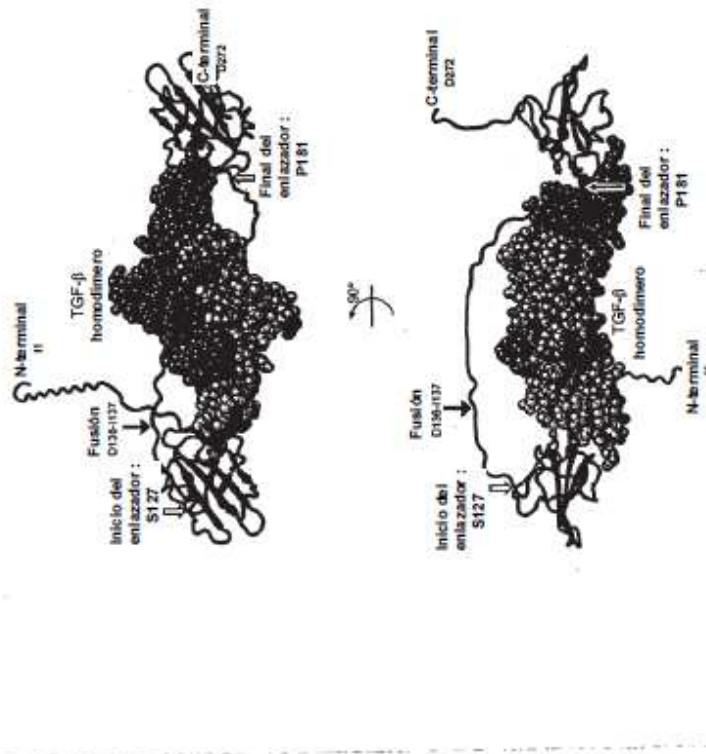


Figura 3: Ilustración de la construcción de la trampa de una sola cadena (TβR-II)² en un modelo de mecánica molecular tridimensional de la trampa de una sola cadena (TβR-II)² unida al factor de crecimiento TGF-β₃. Se proporcionan dos vistas rotadas 90°.

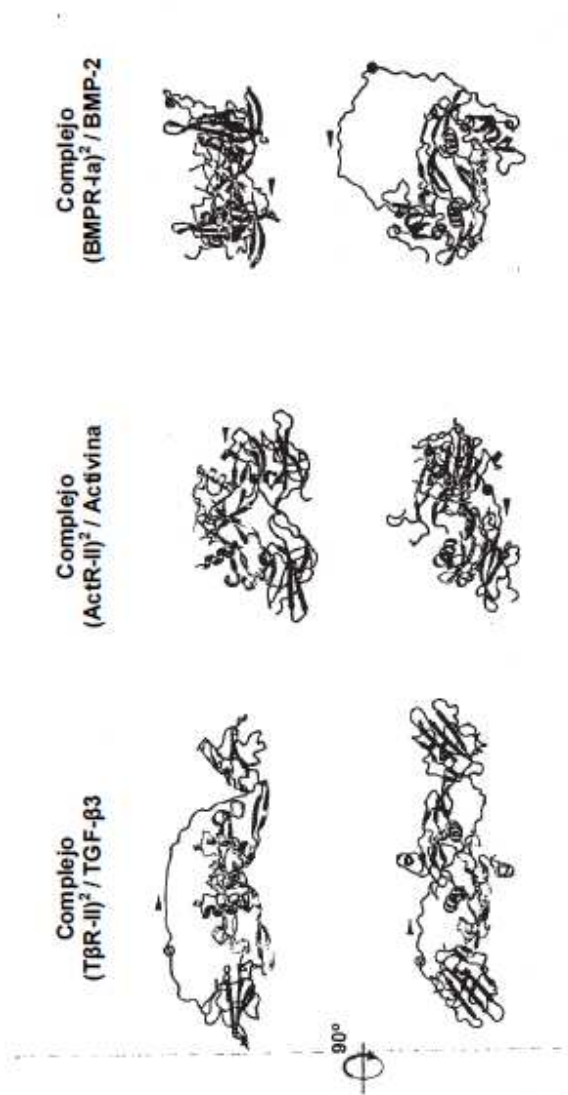


Figura 4. Factibilidad de construcciones de trampas con enlazadores naturales a partir de modelos estructurales tridimensionales. Se muestran enlazadores naturales con energía mecánica molecular minimizada para trampas de una sola cadena homo-bivalente (TβR-II)², (ActR-IIb)² y (BMPR-Ia)² en complejo con los factores de crecimiento TGF-β3, Actívina y BMP-2, respectivamente. Cada dímero covalente de factor de crecimiento se representa en gris. Cada trampa de una sola cadena se representa en negro, y consiste de dos dominios de unión plegados y el enlazador no estructurado de intervención. Cada punto indica el punto de fusión en la región enlazadora entre dos ectodominios del receptor para generar la trampa de una sola cadena. Las puntas de flecha indican la dirección de la cadena polipeptídica en el enlazador de la trampa. Se proporcionan dos vistas rotadas 90° para cada complejo.

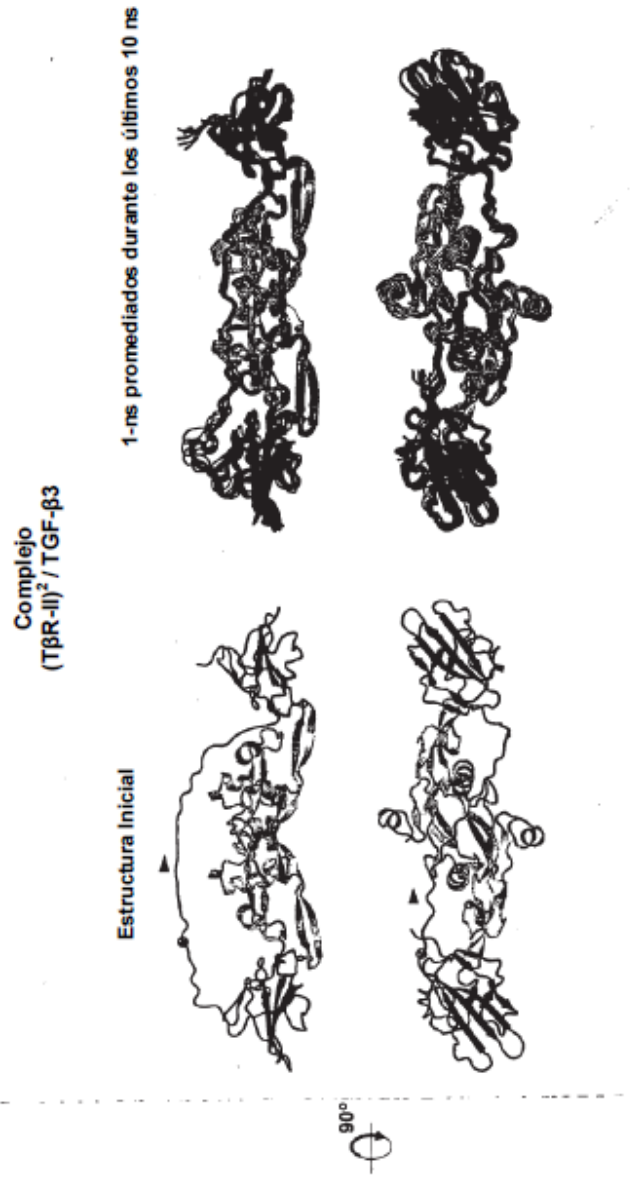


Figura 5A. Modelo de dinámica molecular (MD) para la trampa de una sola cadena homo-bivalente (TβR-II)² unida al factor de crecimiento TGF-β3 (imágenes de la derecha). Un modelo inicial con enlazador de energía minimizada y con dominios de unión de ligandos en posiciones cristalográficas unidas al factor de crecimiento además se muestra por referencia (imágenes de la izquierda, ver además las Figuras 3 y 4). La trampa de una sola cadena se representa en negro y el dímero covalente del factor de crecimiento se representa en gris. Se superponen diez estructuras promediadas en el tiempo (cada una durante 1 ns) que cubren el plazo de 10 ns de la simulación MD. Se proporcionan dos vistas rotadas 90°

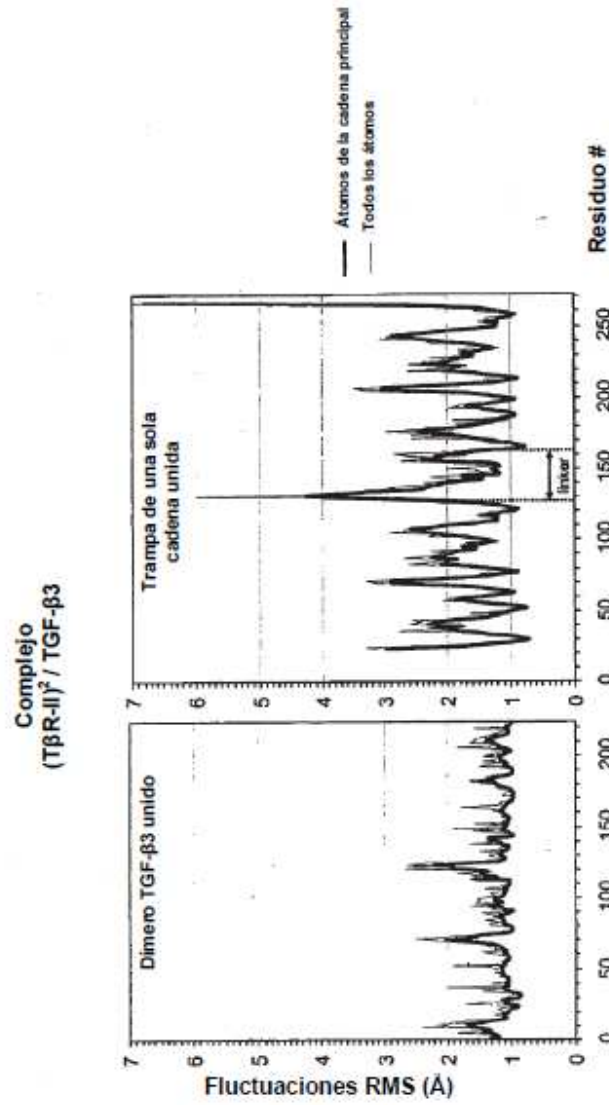


Figura 5B. Fluctuaciones de la raíz cuadrada media por residuo (RMS) de una modalidad del complejo (TβRII)²/TGF-β3, promediadas en el tiempo durante los últimos 10 ns de simulación MD.

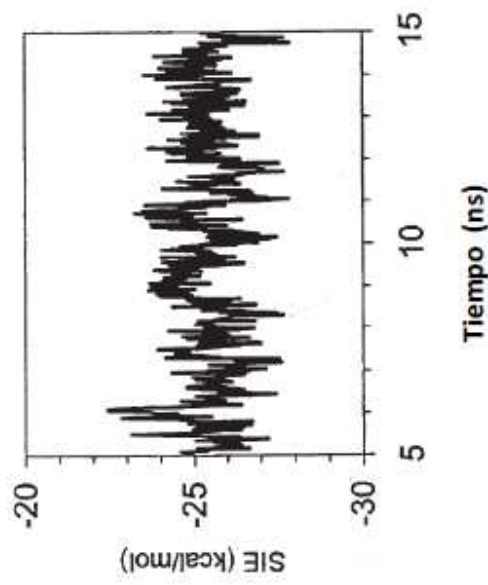


Figura 5C. Energía de interacción solvatada (SIE) entre la trampa de una sola cadena (T β RII)² y el ligando TGF- β 3 durante los últimos 10 ns de simulación MD de sus complejos, con un valor promedio de -25.4 kcal/mol.

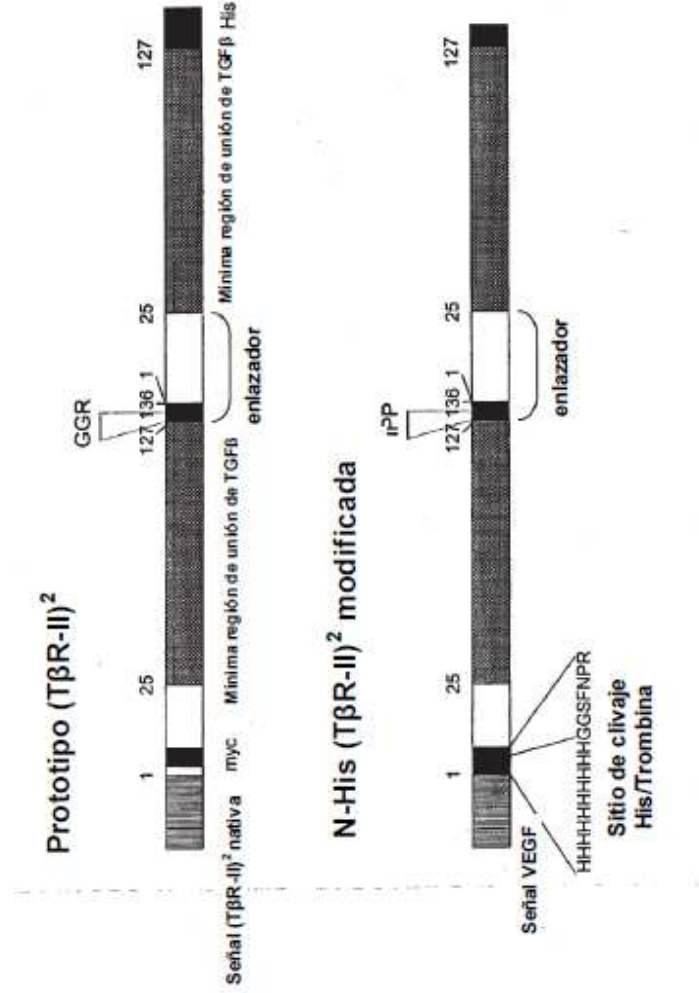


Figura 6. Esquema de prototipo de trampas (TβRII)² y N-His (TβRII)² modificadas.

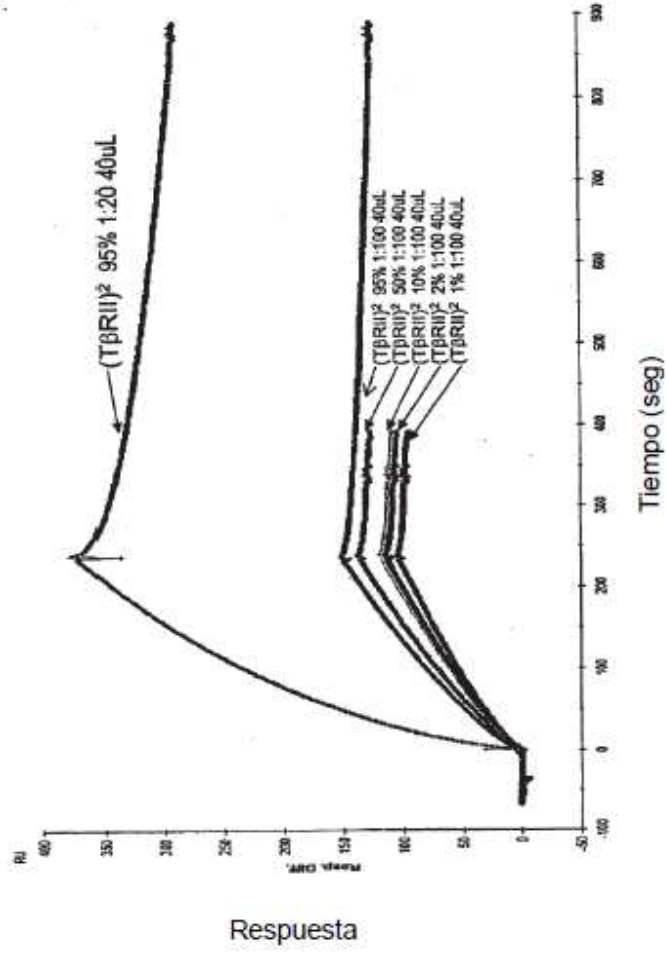
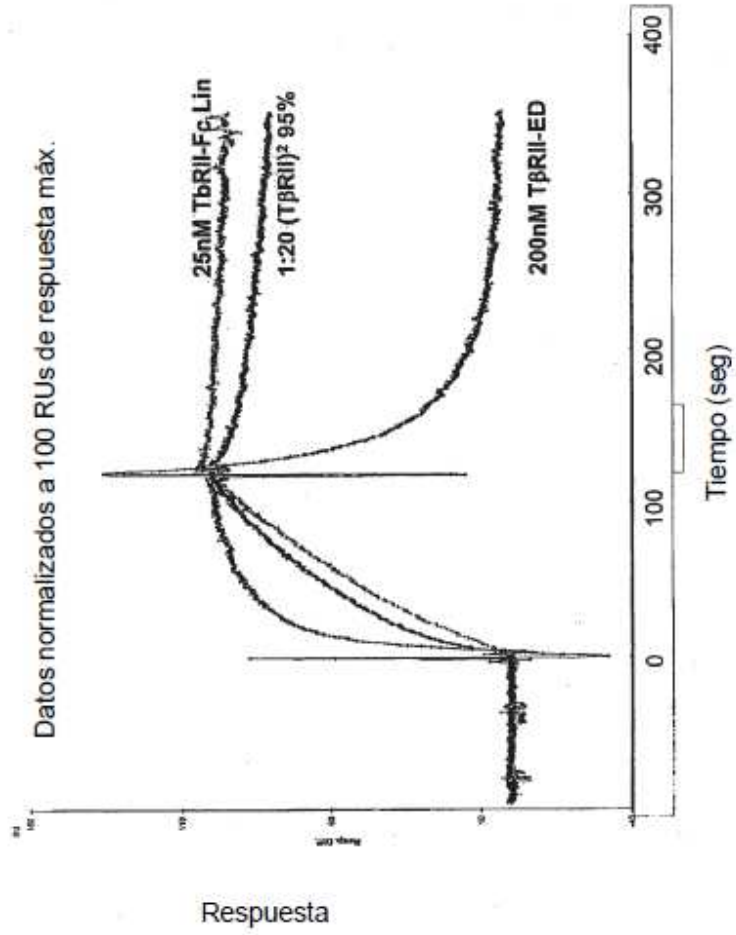


Figura 7A. Sensograma de la resonancia de plasmón superficial que muestra el prototipo (TBR11)₂ (en medio condicionado diluido a partir de diferentes % de las transfecciones

Figura 7B. Sensogramas de la resonancia de plasmón superficial de comparación de la unión del prototipo (TβRII)₂ bivalente, TβRII-Fc bivalente y TβRII monovalente a 270 URs de ligando TGF-β3 inmovilizado en la superficie



Producción de alto nivel de N-His (TβRII)₂ mediante la transfección transitoria de las células 293

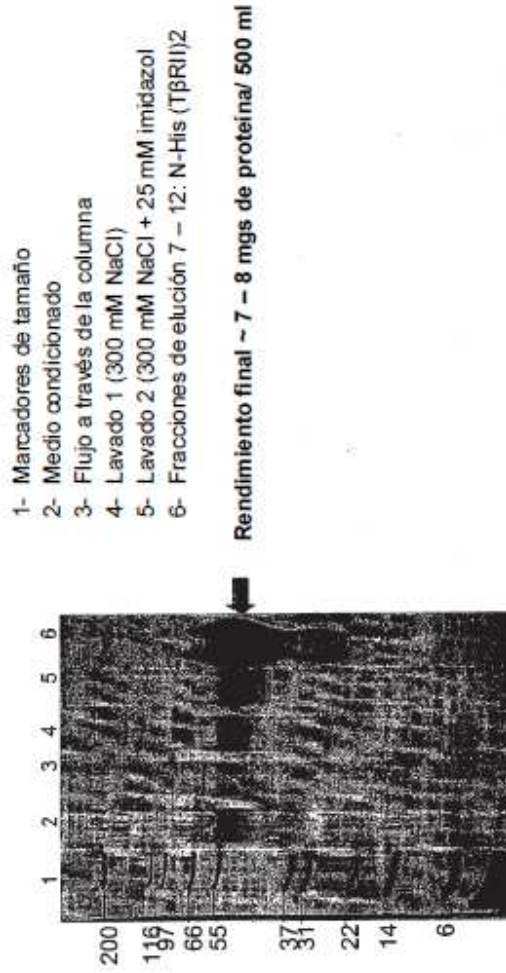


Figura 8. Producción y purificación de alto nivel de rendimiento de la proteína N-His (TβRII)₂ a partir de 500 ml de cultivo de las células 293 transfectadas.

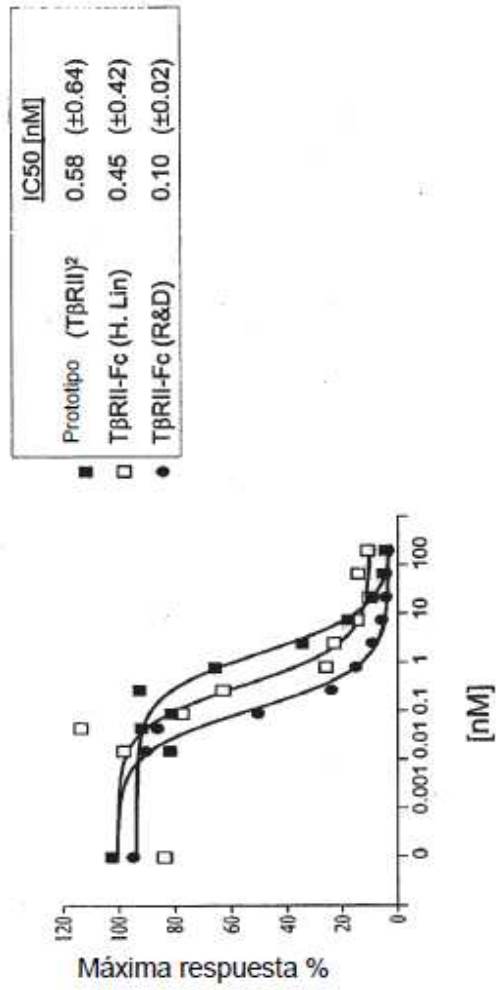


Figura 9A. Inhibición de la señalización de TGF-β en las células reporteras de luciferasa Mv1Lu por una modalidad del prototipo (TβRII)² en comparación con el TβRII-Fc.

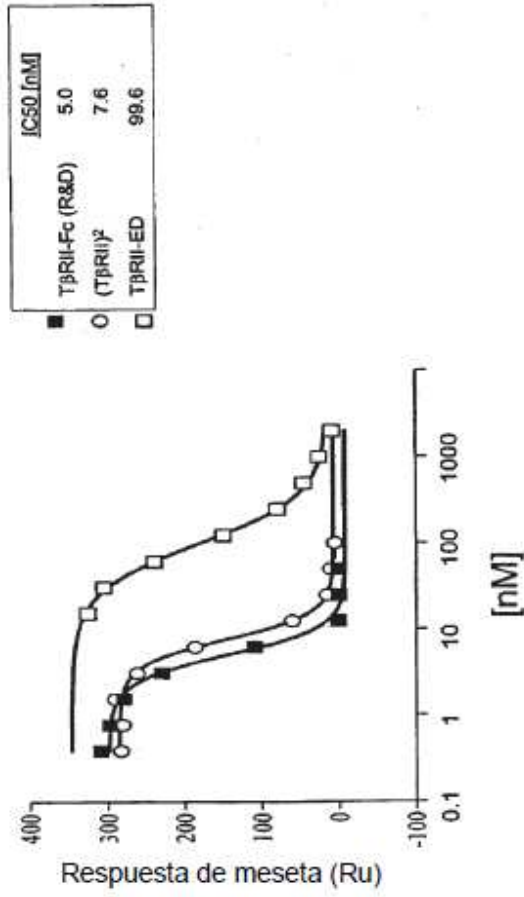


Figura 9B. Determinación basada en SPR de la unión de la trampa de TGF-β en solución mediante el prototipo (TβRII² y TβRII-Fc en comparación con TβRII-ED monomérico.

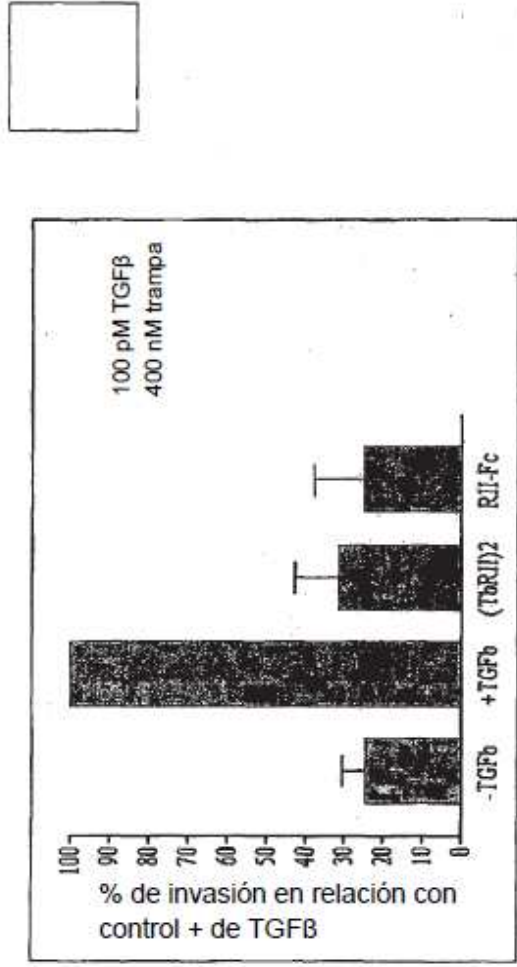


Figura 9C. Inhibición de la invasión de células 4T1 inducida por TGFβ1 *in vitro* mediante el prototipo de trampas (TβRII)₂ y TβRII-Fc.

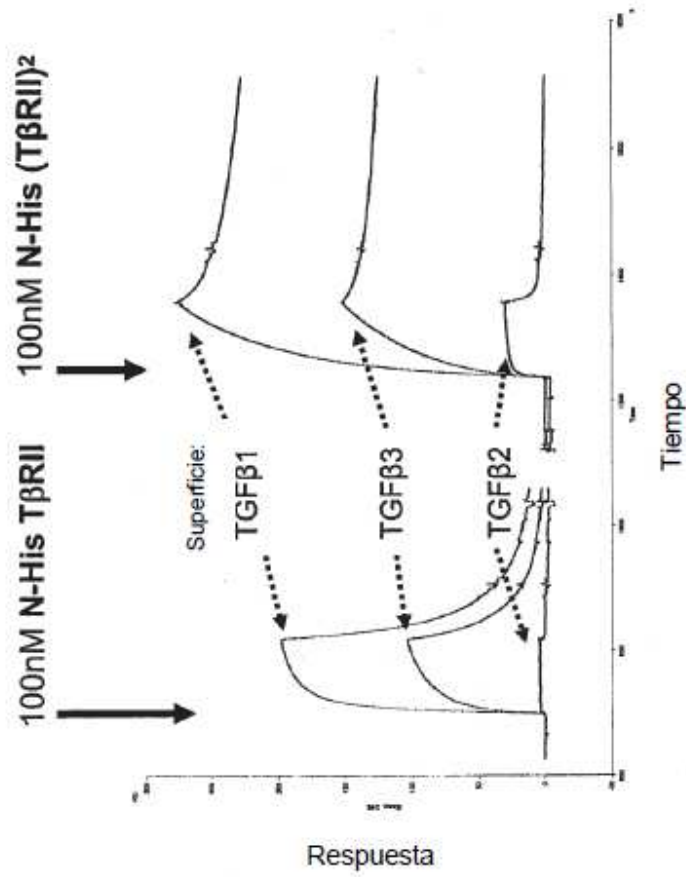


Figura 10A. Sensograma del Biacore™ que muestra la unión directa de N-His (TβRII)² y N-His TβRII monomérico a diferentes isoformas de TGF-β

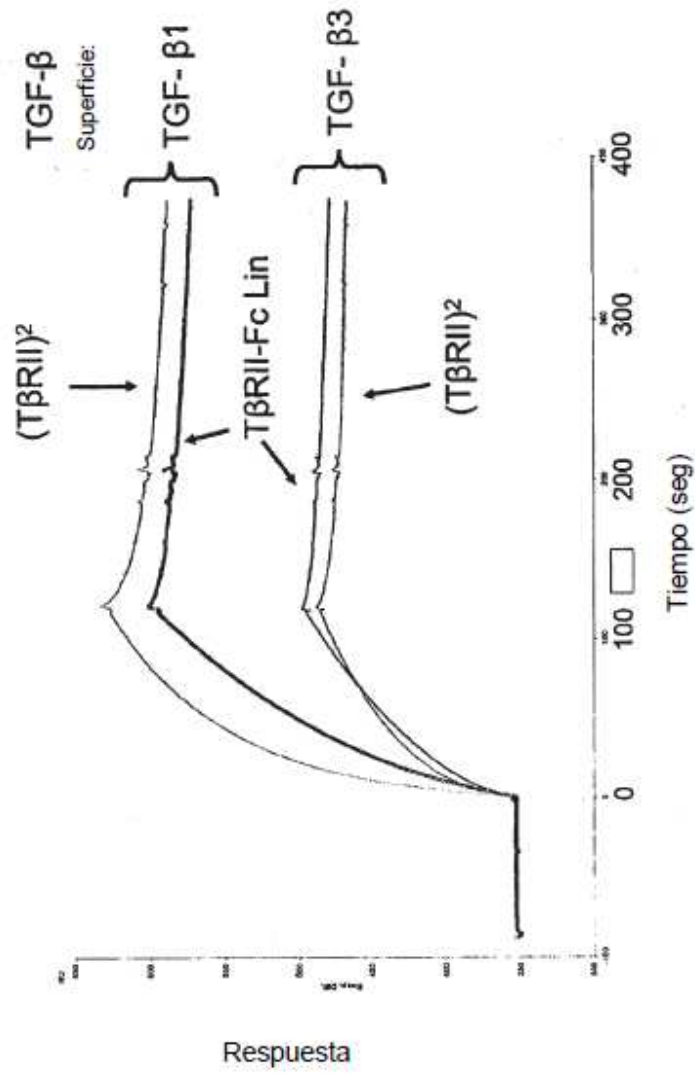


Figura 10B. Comparación de 100 nM de N-His (TβRII)² y TβRII-Fc para unir a 500 RUs cada uno de TGF-β1 o TGF-β3.

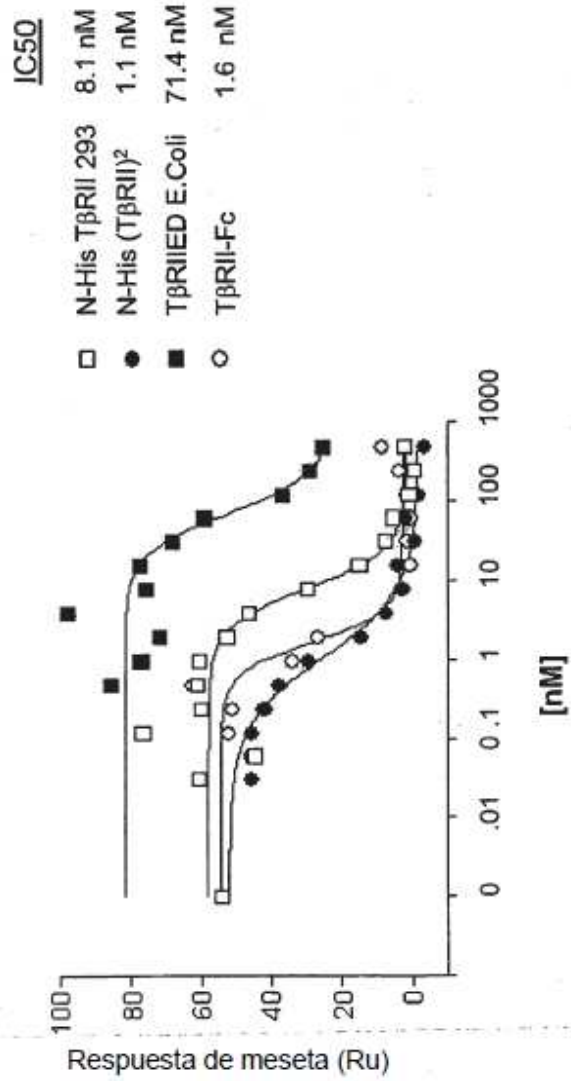


Figura 10C. Determinación basada en SPR de IC50 para la unión de la trampa a TGF-β1 (5 nM) en solución. El gráfico muestra la unión eficiente de TGF-β1 mediante una trampa N-His (TβRII)² y la trampa TβRII-Fc vs la unión reducida mediante el TβRII monomérico (producido en células 293 o producido en E.coli).

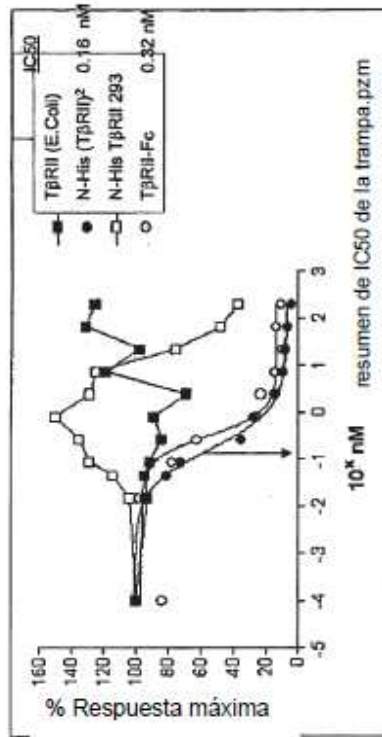


Figura 10D. Inhibición eficiente de la señalización de TGF-β en las células reporteras de luciferasa My1Lu mediante una modalidad de N-His (TβRII)² y TβRII-Fc en comparación con la pobre inhibición mediante el TβRII monomérico (producido en células 293 y producido en E.coli).

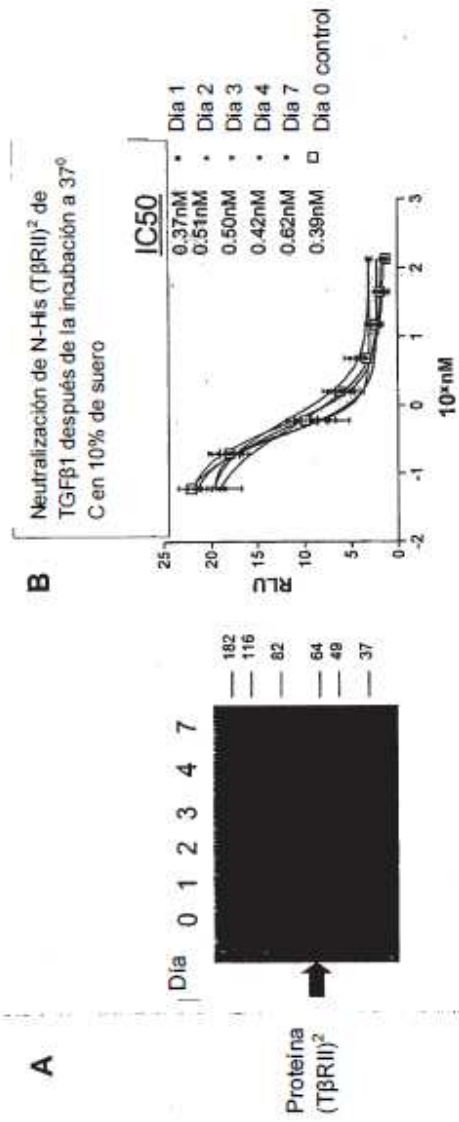


Figura 11. N-His (TβRII)² exhibe estabilidad a largo plazo y actividad en 10% de suero a 37°C.

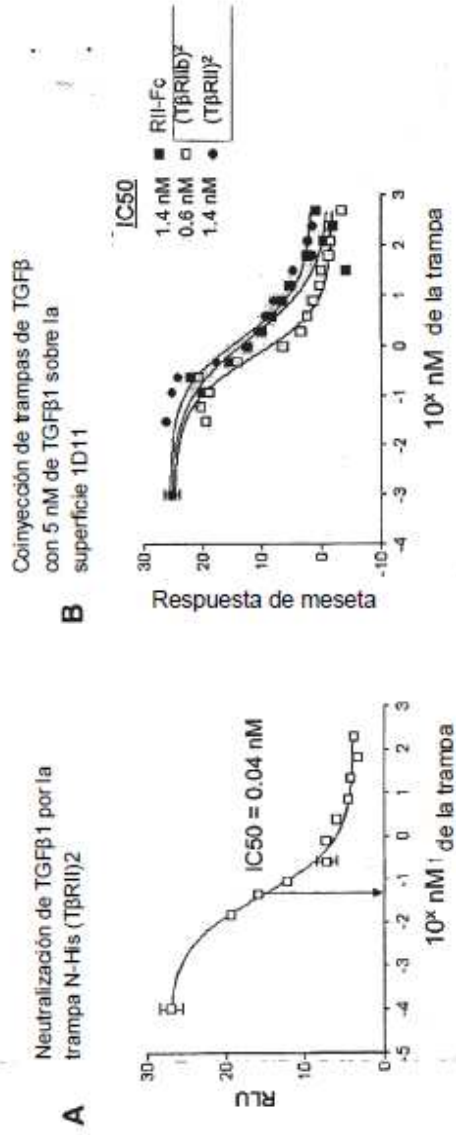


Figura 12. Neutralización eficaz de TGF-β1 (A) y unión de TGF-β1 en solución (B) mediante una trampa (TβRII)² que tiene un enlazador de 60 aminoácidos.

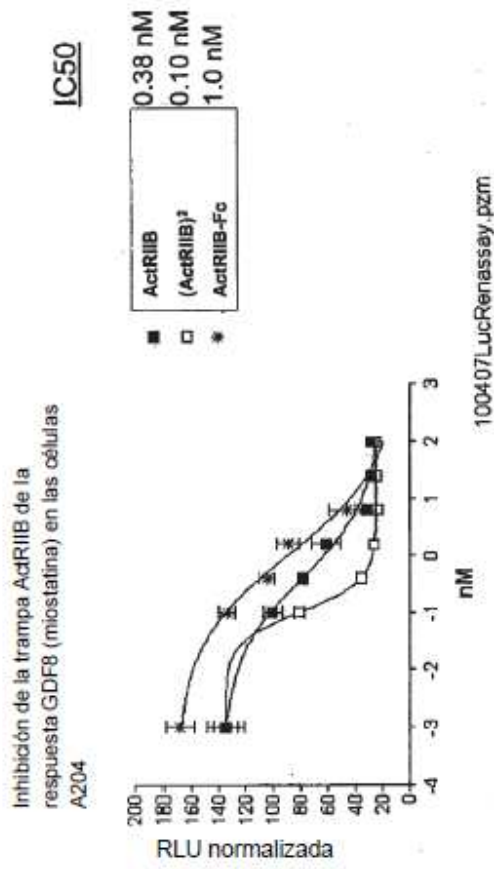


Figura 13. Inhibición eficaz de la señalización de la miostatina en las células A204 mediante una trampa (ActRIIB)₂ en comparación con la inhibición menos potente de ActRIIB-Fc y ActRIIB monomérico.

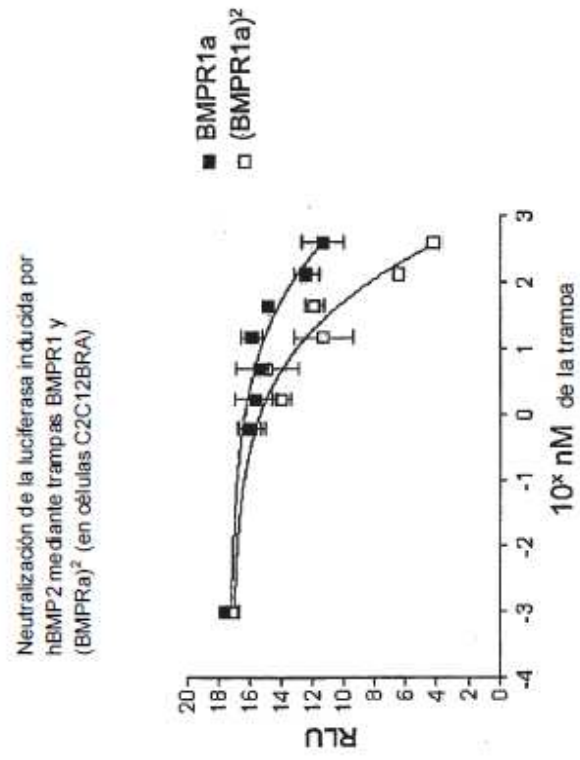


Figura 14. La trampa (BMPR1a)² bivalente es más potente que la trampa BMPR1a monovalente para la neutralización de BMP2.

Figura 15A. Diagramas esquemáticos que ejemplifican fusiones en línea de ectodominios de receptores que conducen a trampas de una sola cadena heterovalente de factores de crecimiento de crecimiento de la superfamilia

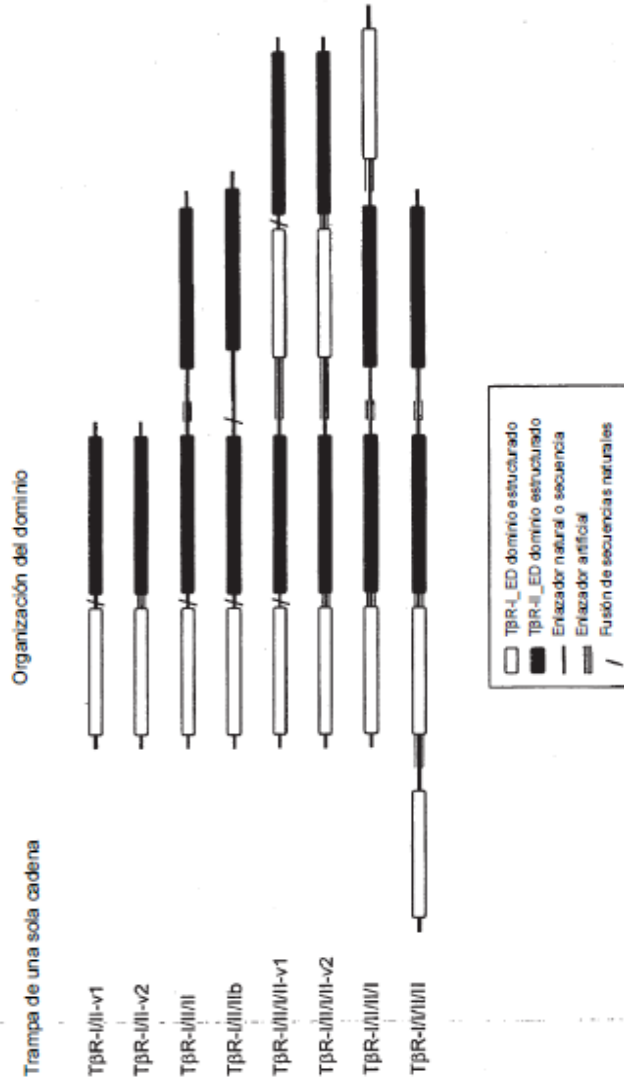


Figura 15B parte 1. Secuencias de aminoácido que ejemplifican trampas de una sola cadena heterovalentes de factores de crecimiento de la superfamilia TGF- β , y correspondiente a los diagramas de organización de dominio representados en el Panel 15A.

TBR-III-v1 sec. con núm. de ident. : 75	<pre> ALLLEGGTALGGPHELCTHEDPFTVYDGLGCPVYVETSTAVTIDRDECAZELDLRDFRVCARGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP </pre>
TBR-III-v2 sec. con núm. de ident. : 76	<pre> AALLLEGGTALGGPHELCTHEDPFTVYDGLGCPVYVETSTAVTIDRDECAZELDLRDFRVCARGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP </pre>
TBR-III sec. con núm. de ident. : 77	<pre> AALLLEGGTALGGPHELCTHEDPFTVYDGLGCPVYVETSTAVTIDRDECAZELDLRDFRVCARGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP GGSSGGSSGGSSGGLLPIHQDQSTINNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP SPTCINRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP </pre>
TBR-III/b sec. con núm. de ident. : 78	<pre> AALLLEGGTALGGPHELCTHEDPFTVYDGLGCPVYVETSTAVTIDRDECAZELDLRDFRVCARGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP IPDQVYGRDQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP KLPTRFTIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP </pre>
TBR-III/III-v1 sec. con núm. de ident. : 79	<pre> AALLLEGGTALGGPHELCTHEDPFTVYDGLGCPVYVETSTAVTIDRDECAZELDLRDFRVCARGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP CDVWRFTQWQSGDHNCSITSSCGKPKQVCVAVWVGGDNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP GGSSGGSSGGSSGGLLPIHQDQSTINNRHTITLTYVGRKPLPTDFIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP KLPTRFTIIDAADAPKCDRGGDGGVSTFTYDCKDGRKMSLPTVTVGGAGAVTFPOLCKP </pre>

Clave: subrayado: secuencia o enlaceador natural; subrayado itálica: enlaceador artificial; itálica o acentuado: dominio estructurado TBR-III-ED; acentuado: dominio estructurado TBR-III-ED; región no estructurada de TBR-III-ED que llega a estar estructurada en el complejo ternario TBR-III/TBR-III/TGF- β (Groppe y otros, 2008)

